

Interferon- α vermittelte Immuntherapie in der Friend Retrovirus Infektion

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.

der Fakultät für
Biologie und Geografie
an der
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Kathrin Gibbert

aus Traben-Trarbach
September 2010

Für meine Familie

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Virologie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Ulf Dittmer

2. Gutachter: Prof. Dr. Astrid Westendorf

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Hardy Pfan

Tag der mündlichen Prüfung: 08.12.2010

Inhalt

1	EINLEITUNG	1
1.1	Das Immunsystem.....	1
1.1.1	Das angeborene Immunsystem.....	1
1.1.1.1	Die zellulären Bestandteile des angeborenen Immunsystems	1
1.1.1.2	Mustererkennende Rezeptoren (<i>pattern recognition receptors</i> , PRR).....	2
1.1.1.3	Typ I Interferone	7
1.1.1.3.1	Antiviraler Zustand	9
1.1.1.3.2	Strategien der viralen Immunevasion der Typ I Interferon-Antwort	9
1.1.1.3.3	Immunomodulatorische Eigenschaften von IFN α / β	11
1.1.2	Das adaptive Immunsystem	12
1.1.2.1	Die zelluläre Immunantwort.....	12
1.1.2.1.1	T-Helferzellen.....	12
1.1.2.1.2	Zytotoxische T-Zellen.....	13
1.2	Retroviren.....	15
1.2.1	Aufbau von Retroviren	16
1.2.2	Replikationszyklus von Retroviren.....	17
1.2.3	HIV	18
1.2.4	Tiermodelle für retrovirale Infektionen	19
1.2.5	Pathogenese des Friend Virus Komplexes	20
1.2.6	Immunität gegen eine Friend Virus-Infektion.....	21
1.2.6.1	Krankheitsverläufe verschiedener Mausstämmen nach Friend Virus-Infektion	22
1.3	Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	25
2	MATERIAL.....	26
2.1	Geräte	26
2.2	Verbrauchsmaterial	27
2.3	Versuchstiere.....	28
2.3.1	Wildtyp Mäuse	28
2.3.2	Knockout ^(-/-) Mäuse	28
2.4	Chemikalien und Medien	28
2.5	Zytokine und TLR-Liganden	29
2.6	Antibiotika	29

2.7	Häufig verwendete Puffer und Medien	29
2.8	Antikörper	31
2.9	Tetramere und F-MuLV spezifische Peptide.....	32
2.10	Kommerzielle Standardtests	33
2.11	Viren und Zelllinien	33
2.12	Oligonukleotide und Sonden	34
2.13	Plasmide	36
3	METHODEN.....	37
3.1	Versuchstiere.....	37
3.1.1	Infektion	37
3.1.2	Intraperitoneale Injektion	37
3.1.3	Injektion von Poly I:C	37
3.1.4	Injektion von IFN α	37
3.1.5	Betäubung der Mäuse mit Isofluran®	38
3.1.6	Palpieren von Milzgrößen	38
3.1.7	Blutentnahme.....	38
3.1.8	Organentnahme.....	38
3.2	<i>In vivo</i> CTL Assay.....	38
3.3	<i>In vivo</i> Herstellung eines Friend Virus Stocks	39
3.4	Herstellung eines F-MuLV-Stocks <i>in vitro</i>	40
3.5	Zellzahlbestimmung	40
3.6	Zellkultur	41
3.6.1	Kultivierung von Zellen	41
3.6.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	41
3.6.3	Stimulation von Zellen mit Poly I:C	42
3.7	Herstellung einer Milzsuspension	42
3.8	Nachweis von infektiösen Zellen mit Hilfe des <i>Infectious Center Assays</i>	42
3.9	Interferon Inhibitionsassay	44
3.10	Bestimmung der Typ I Interferon-Konzentration mit Hilfe eines Mx/Rage-Bioassays....	44

3.11	Sortieren und Isolieren von Lymphozyten aus einem Zellgemisch mittels MACS	45
3.12	Durchflusszytometrie.....	45
3.12.1	Färbung von Oberflächenproteinen	47
3.12.2	Intrazelluläre Färbung von Granzym B (GzmB)	48
3.12.3	Intrazelluläre Färbung von IFN γ , TNF α und IL-2	48
3.12.4	Bestimmung der Prozentzahl von FV-infizierten Zellen im Blut	49
3.12.5	Tetramerfärbung	49
3.13	Proteinnachweis mittels ELISA.....	50
3.13.1	IFN α ELISA	51
3.13.2	<i>Bead Array</i> zum Nachweis diverser Zytokine und Chemokine	51
3.13.3	Bestimmung von Friend Virus-bindenden Antikörpern (MuLV-ELISA).....	51
3.14	Depletion von Lymphozyten mit Hilfe zellspezifischer Antikörper	52
3.15	Bestimmung von Friend Virus-neutralisierenden Antikörpern	52
3.16	Bakterienhaltung	53
3.17	Säulenaufreinigung von Plasmid-DNA (Megapräparation).....	53
3.18	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	53
3.19	Kalziumphosphat-Transfektion von 293T-Zellen	53
3.20	Arbeiten mit RNA.....	54
3.20.1	Isolierung von Gesamt-RNA mittels TRIZOL [®]	54
3.20.2	Aufreinigung der isolierten RNA	54
3.20.3	<i>Real Time</i> SYBR Green PCR (<i>One Step</i>)	55
3.20.4	<i>Real Time</i> TaqMan-PCR	56
3.20.5	<i>Two Step</i> TaqMan-PCR für die Quantifizierung von Friend Virus.....	57
4	ERGEBNISSE.....	59
4.1	Induktion von Typ I Interferon in FV-infizierten Mäuse nach Poly I:C-Injektion	59
4.2	Poly I:C-Behandlung in der akuten FV-Infektion bewirkt eine Reduktion der Viruslast .	60
4.3	Poly I:C-Behandlung verhindert die Entstehung einer letalen Erythroleukämie.....	63
4.4	Poly I:C-Behandlung in der chronischen FV-Infektion bewirkt eine Reduktion der Viruslast.....	66
4.5	Direkte antivirale Effekte von Poly I:C.....	68

4.6	Modulatorische Effekte von Poly I:C auf Immunzellen.....	71
4.6.1	Poly I:C-Behandlung in der akuten FV-Infektion erhöht die Anzahl an aktivierten B-Zellen	71
4.6.2	Poly I:C-Behandlung in der akuten FV-Infektion erhöht die Anzahl an aktivierten NK-Zellen	73
4.6.3	Depletionsexperimente deuten auf eine wichtige Rolle von CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen während der Behandlung mit Poly I:C hin	75
4.6.4	Poly I:C-Therapie induziert die Aktivierung von CD4 ⁺ T-Zellen.....	78
4.6.4.1	Die Poly I:C-Behandlung führt zu keiner Expansion von FV-spezifischen CD4 ⁺ T-Zellen	78
4.6.4.2	Verbesserte Funktion der Effektor-CD4 ⁺ T-Zellen nach Poly I:C-Behandlung	79
4.6.5	Poly I:C-Therapie induziert die Aktivierung von CD8 ⁺ T-Zellen.....	83
4.6.5.1	Die Poly I:C-Behandlung führt zu keiner Expansion von FV-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen	83
4.6.5.2	Verbesserte Funktion der Effektor-CD8 ⁺ T-Zellen nach Poly I:C-Behandlung	84
4.6.5.3	Verbesserte Funktion der Effektor-CD8 ⁺ T-Zellen nach Poly I:C-Behandlung <i>in vivo</i>	85
4.6.6	Die Granzym B-Produktion alleine spielt eine untergeordnete Rolle für die Poly I:C-Therapie.....	87
4.7	Poly I:C induziert neben IFNα auch diverse Chemokine in der Milz	89
4.8	Die therapeutischen Effekte von Poly I:C sind abhängig von MDA5 und TLR3	91
4.9	Poly I:C induziert viele verschiedene IFNα-Subtypen	95
4.10	IFNα5 und IFNα11 wirken antiretroviral <i>in vitro</i>	96
4.11	Behandlung mit IFNα11 in der akuten FV-Infektion führt zur Reduktion der Viruslast ..	97
4.12	Modulatorische Effekte von IFNα11 auf Immunzellen	100
4.12.1	IFN α 11-Behandlung in der akuten FV-Infektion erhöht die Anzahl an aktivierten B-Zellen	100
4.12.2	IFN α 11-Behandlung in der akuten FV-Infektion erhöht die Anzahl an aktivierten NK-Zellen	101
4.12.3	IFN α 11-Therapie induziert die Aktivierung von CD4 ⁺ T-Zellen	102
4.12.4	IFN α 11-Therapie induziert die Aktivierung von CD8 ⁺ T-Zellen	104
5	DISKUSSION.....	107
6	ZUSAMMENFASSUNG	117

7	LITERATURVERZEICHNIS	119
8	ANHANG	132
8.1	Abkürzungsverzeichnis	132
8.2	Abbildungsverzeichnis	138
8.3	Tabellenverzeichnis	141
8.4	Danksagung	142
8.5	Lebenslauf.....	144
8.6	Erklärungen.....	146

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem bekämpft in einen Organismus eingedrungene, körperfremde Strukturen. Es kann aber auch körpereigene Zellen zerstören, wenn diese sich fehlerhaft verändert haben. Im Laufe der Stammesgeschichte entwickelte sich das Immunsystem zu einem immer komplexeren System. Schon Wirbellose besitzen unspezifische Abwehrmechanismen, die so genannte angeborene Immunabwehr. Wirbeltiere entwickelten zusätzlich einen komplexen spezifischen Mechanismus, die so genannte adaptive Immunabwehr, die einen spezifischen Schutz vor Krankheitserregern bietet und zusätzlich ein Gedächtnis für eine schnellere Abwehr bei späteren Infektionen mit dem gleichen Erreger etabliert (143).

1.1.1 Das angeborene Immunsystem

1.1.1.1 Die zellulären Bestandteile des angeborenen Immunsystems

Das angeborene Immunsystem dient der ersten Erkennung von Pathogenen und deren Abwehr. Zu den Zellen des angeborenen Immunsystems zählen Makrophagen, Dendritische Zellen (DC), Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Neutrophile, Basophile und Eosinophile (57). Makrophagen dienen der Beseitigung von Mikroorganismen, die auf Grund von körperfremden Proteinen auf ihrer Oberfläche erkannt und anschließend phagozytiert werden. Danach werden sie intrazellulär abgebaut, und die entstandenen Antigene werden durch den Haupthistokompatibilitätskomplex der Klasse I (MHC-I) oder Klasse II (MHC-II) auf der Oberfläche der Makrophagen präsentiert (1). Dendritische Zellen weisen eine ähnliche Funktionsweise auf. Anhand des Reifestadiums unterscheidet man zwischen reifen und unreifen DCs. Unreife DCs (uDC) zeichnen sich dadurch aus, dass sie in der Peripherie des Organismus lokalisiert sind und sich auf ihrer Oberfläche nur geringe Mengen MHC-I, MHC-II und T-Zell-kostimulatorische Moleküle (CD80 und CD86) befinden (193). Ihre Hauptaufgabe besteht darin, eingedrungene Erreger zu erkennen und diese aufzunehmen (193). Nach Aktivierung migrieren uDC in den nächsten lokalen Lymphknoten, um dort Antigene der internalisierten Pathogene T- und B-Lymphozyten zu präsentieren. Durch die Aufnahme der Erreger beginnen uDC zu reifen, was zur Folge hat, dass

phagozytotische Rezeptoren verloren gehen und kostimulatorische Moleküle (CD80, CD86, CD40), MHC-I und II sowie Adhäsionsmoleküle hochreguliert werden (13). Die reifen DC (rDC) verlieren dadurch die Fähigkeit Antigene aufzunehmen und fungieren nun als Antigen-präsentierende Zellen (APC). Im Lymphknoten nehmen rDC dann Kontakt mit T-Lymphozyten auf, um eine Immunantwort einzuleiten. Sie vermitteln somit zwischen der angeborenen und der adaptiven Immunantwort (181).

NK-Zellen können virus-infizierte Zellen oder Krebszellen erkennen, da diese im Gegensatz zu gesunden Zellen weniger oder keine MHC-Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren (28). NK-Zellen töten diese dann durch die Ausschüttung zytotoxischer Moleküle oder die Sekretion von Interferon (IFN) γ ab.

Neben den zellulären Komponenten gehören zum angeborenen Immunsystem auch andere Komponenten, wie z.B. das Komplementsystem. Dabei handelt es sich um ein Zusammenspiel proteolytischer Enzyme, welche über drei verschiedene Wege Gram-negative Bakterien und Viren durch Lyse inaktivieren, lokale Entzündungsreaktionen hervorrufen und Erreger für eine Eliminierung durch Phagozytose opsonisieren können (59).

1.1.1.2 Mustererkennende Rezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRR)

Damit eine Immunantwort eingeleitet wird, ist eine gezielte Erkennung von eindringenden Erregern nötig. Es existieren keimbahnkodierte Rezeptoren, sogenannte PRR, welche bestimmte pathogenassoziierte molekulare Muster (*pathogen associated molecular pattern*, PAMPs) von Erregern erkennen (17, 97). Zu ihnen gehören die auf der Oberfläche und in den Endosomen lokalisierten Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLR), im Zytosol vorkommende RIG-I (*retinoic acid-inducible gene 1*) ähnlichen RNA Helikasen (RLH) und NOD (*nucleotide binding oligomerization domain*) -ähnlichen Rezeptoren (NLR).

Die Familie der TLR besteht im humanen System aus 10 Mitglieder und in der Maus gibt es 12 verschiedene Vertreter dieser Rezeptoren, welche viele verschiedene PAMPs erkennen (5). In Tabelle 1.1 sind die Rezeptoren mit ihren dazugehörigen Liganden aufgelistet. Des Weiteren ist gezeigt, wo die TLR in der Zelle lokalisiert sind.

Tabelle 1.1 Die TLR und ihre Liganden

Rezeptor	Ligand	Organismus	Lokalisation in der Zelle
TLR1	Triacyl-Lipopeptid	Bakterien	Zelloberfläche
TLR2	Lipopeptide/Lipoproteine Peptidoglykan Lipoteichonsäure Glycosylphosphatidylinositol Zymosan	Bakterien Bakterien gram-positive Bakterien <i>T. cruzi</i> , <i>P. falciparum</i> Pilze	Zelloberfläche
TLR3	dsRNA Poly I:C	Virus synthetisch	Endosomen
TLR4	LPS Taxol Peptidoglykan Hitzeschockproteine Fibrinogen	gram-negative Bakterien Pflanzen Mykobakterien Wirt Wirt	Zelloberfläche
TLR5	Flagellin	Bakterien	Zelloberfläche
TLR6	Diacyl-Lipopeptide	Mykobakterien	Zelloberfläche
TLR7	ssRNA Imidazoquinoline Loxoribine	Virus synthetisch synthetisch	Endosomen
TLR8	ssRNA Imidazoquinoline	Virus synthetisch	Endosomen
TLR9	CpG-DNA	Bakterien Viren synthetisch	Endosomen
TLR10	unbekannt	unbekannt	Zelloberfläche
TLR11	Profilin-ähnliche Moleküle	<i>T. gondii</i>	Zelloberfläche
TLR12	unbekannt	unbekannt	unbekannt
TLR13	unbekannt	unbekannt	unbekannt
TLR15	unbekannt	unbekannt	unbekannt

Nach Bindung der verschiedenen Liganden an den jeweiligen Rezeptor kommt es zur Aktivierung einer Signalkaskade. Diese beginnt mit Ausnahme von TLR3 mit der Bindung des Adaptormoleküls MyD88 (*Myeloid differentiation primary response*

gene) an den zytoplasmatischen Teil des Rezeptor, so dass es im weiteren Verlauf zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) kommt. Dieser transloziert in den Zellkern und induziert dort die Expression von proinflammatorischen Zytokinen. Im Falle des endosomalen TLR3 verläuft die Signalkaskade unabhängig von MyD88, aber durch das Adaptorprotein TRIF (*Toll-Interleukin-1-resistance (TIR) domain-containing adaptor inducing IFN β*), welches an TLR3 bindet und anschließend weitere Enzyme aktiviert. Die Signalwege nach Bindung von dsRNA an TLR3 sind in Abbildung 1.1 gezeigt.

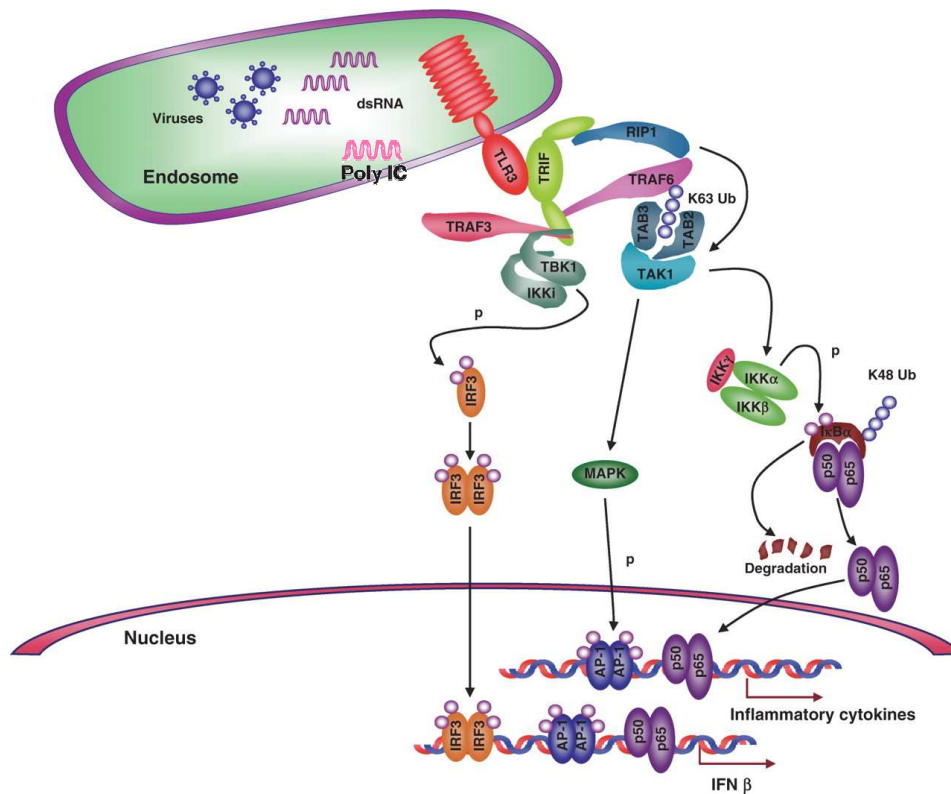


Abbildung 1.1 TLR3 Signalweg ; verändert nach (103)

TLR3 rekrutiert TRIF, welches mit TRAF3¹, TBK1² und IKKi³ interagiert. TBK1 und IKKi induzieren die Phosphorylierung (P) von IRF3⁴, welches dimerisiert und dann in den Nucleus wandert. Dort bindet es an die DNA und induziert die Expression von IFN β . TRIF kann auch mit RIP1⁵ und TRAF6 wechselwirken, und vermittelt dadurch die Aktivierung von NF- κ B. Dazu aktiviert es den TAK1/ TAB2/ TAB3⁶-Komplex über eine Ubiquitinierung (Ub). Der aktivierte TAK1-Komplex aktiviert dann den IKK-Komplex, welches wiederum die Phosphorylierung von I κ B induziert. Es kommt zur Ubiquitinierung von I κ B, so dass NF- κ B in den Nucleus translozieren kann. TAK1 stimuliert gleichzeitig den MAPK⁷-Kinase-Signalweg, so dass es zur Phosphorylierung und Aktivierung von AP-1 kommt. NF- κ B und AP-1 induzieren so die Expression von proinflammatorischen Zytokinen.

Zu den RIG-I ähnlichen RNA Helikasen gehören die Rezeptoren MDA5 (*melanoma differentiation-associated gene 5*), RIG-I und LGP2 (*laboratory of genetics and physiology-2*), wobei es sich um zytoplasmatische Helikasen handelt. Sie spielen für

¹ Tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor 3

² TRAF family member-associated NF- κ B activator (TANK)-binding kinase 1

³ Induced I κ B kinase

⁴ Interferon regulatory factor 3

⁵ Receptor-interacting protein 1

⁶ transforming growth factor- β -activated kinase (TAK) 1-binding proteins

⁷ Mitogen-activated protein kinase

die Erkennung von dsRNA, welche während diversen viralen Infektionen gebildet werden, eine große Rolle (z.B. Newcastle-Disease-Virus (NDV), Sendaivirus (SeV), Vesikuläres Stomatitis Virus (VSV), Influenzavirus, Enzephalomyocarditis Virus (EMCV) (103)). Nach Bindung der dsRNA erfolgt die Rekrutierung des Apaptorproteins IPS-1 (*IFN β promotor stimulator protein 1*), was schliesslich in einer Aktivierung von NF- κ B oder IRF3 resultiert. Diese Transkriptionsfaktoren gehen dann in den Zellkern und induzieren die Expression von Typ I Interferon (IFN) und proinflammatorischen Zytokinen. Die Signalwege von RIG-I und MDA5 sind in Abbildung 1.2 schematisch dargestellt.

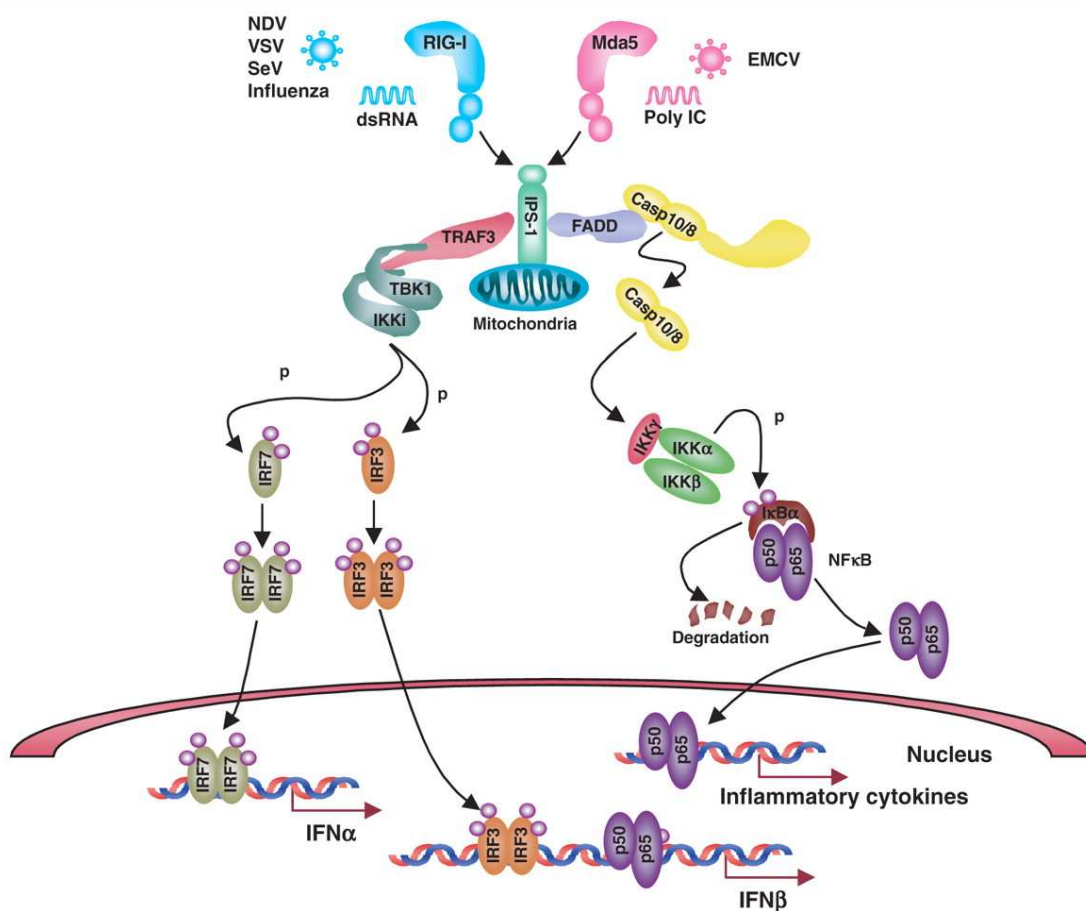


Abbildung 1.2 RLH-Signalwege (103)

Nach der Bindung von dsRNA an RIG-I oder MDA5 werden diese durch das Apaptorprotein IPS-1 zur äußeren Mitochondrienmembran rekrutiert, wo es zur nachfolgenden Aktivierung diverser Transkriptionsfaktoren wie IRF3, IRF7 und NF- κ B kommt. IRF3 und IRF7 kontrollieren die Expression von Typ I IFN, während NF- κ B die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen reguliert.

Neben den endosomalen TLR detektieren also auch die zytoplasmatischen Helikasen virale Muster. Um virale Muster zu erkennen hat das Immunsystem also zwei unabhängige Sensoren in den Endosomen und im Zytosol entwickelt. Dies

zeigt, wie wichtig die redundanten Signalwege in der Erkennung von Virusinfektionen sind.

Die dritte Familie der PRRs sind die NOD-ähnlichen Rezeptoren (NLR). Dazu gehören mehr als 20 verschiedene Vertreter wie z.B. NOD1,2 und NALP-Proteine (*NACHT-LRR-PYD-containing protein*), die alle im Zytosol lokalisiert sind. Diese Rezeptoren dienen hauptsächlich als Sensor für bakterielle Muster (30). Nach Erkennung und Bindung dieser kommt es zur Aktivierung des NF- κ B-Signalweges über RIP2 und die Aktivierung von AP-1 durch den MAP-Kinase Signalweg (92).

Durch die Bindung all dieser verschiedenen PAMPs an die entsprechenden Rezeptoren kommt es zur Aktivierung verschiedener Signalwege, welche alle in der Expression von Typ IFN und proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , Interleukin (IL)-6 und IL-12 (18, 97) resultieren.

1.1.1.3 Typ I Interferone

Die Interferone sind eine Gruppe von sekretierten Zytokinen mit unterschiedlichen antiviralen Eigenschaften. Die Interferone teilen sich auf in drei verschiedene Gruppen: Typ I, Typ II und Typ III Interferone. Die Typ I Interferone bilden eine große Gruppe diverser Moleküle mit unterschiedlichen biologischen Eigenschaften. Dazu gehören IFN α , IFN β und andere Interferone wie IFN ω , IFN ϵ , IFN τ , IFN δ und IFN κ . Als Typ II Interferon bezeichnet man IFN γ , welches von NK-Zellen und T-Zellen sezerniert wird. IFN γ aktiviert Makrophagen und verstärkt deren antimikrobielle Aktivität. Die Gruppe der Typ III Interferone setzt sich zusammen aus IFN λ 1, IFN λ 2 und IFN λ 3, welche auch als IL-29, IL28A und IL-28B bezeichnet werden. Diese werden im Laufe von Virusinfektionen produziert und spielen eine wichtige Rolle in der mukosalen Immunreaktion gegen Viren (178).

In der Gruppe der Typ I IFN gibt es in Säugetieren mehr als 14 unterschiedliche Gene für IFN α , welche für verschiedene Subtypen kodieren. Es existiert jedoch nur ein Gen für IFN β . Diese IFN α -Subtypen weisen diverse biologische Aktivitäten auf (39, 40, 58, 65, 96, 192), obwohl sie alle an den gleichen Rezeptor, den Interferon- α/β -Rezeptor (IFNAR), binden. Im humanen System wurde allerdings gezeigt, dass die verschiedenen IFN α -Subtypen mit sehr unterschiedlichen Affinitäten an den Rezeptor binden (95), was ein Hinweis für die diversen biologischen Aktivitäten sein könnte. Der Interferon- α/β -Rezeptor besteht aus den beiden Untereinheiten IFNAR1 und IFNAR2, welche nach der Bindung von Typ I IFN dimerisieren und eine STAT1/2

(*Signal transducers and activators of transcription*)-abhängige Signalkaskade wie in Abbildung 1.3 gezeigt, auslösen.

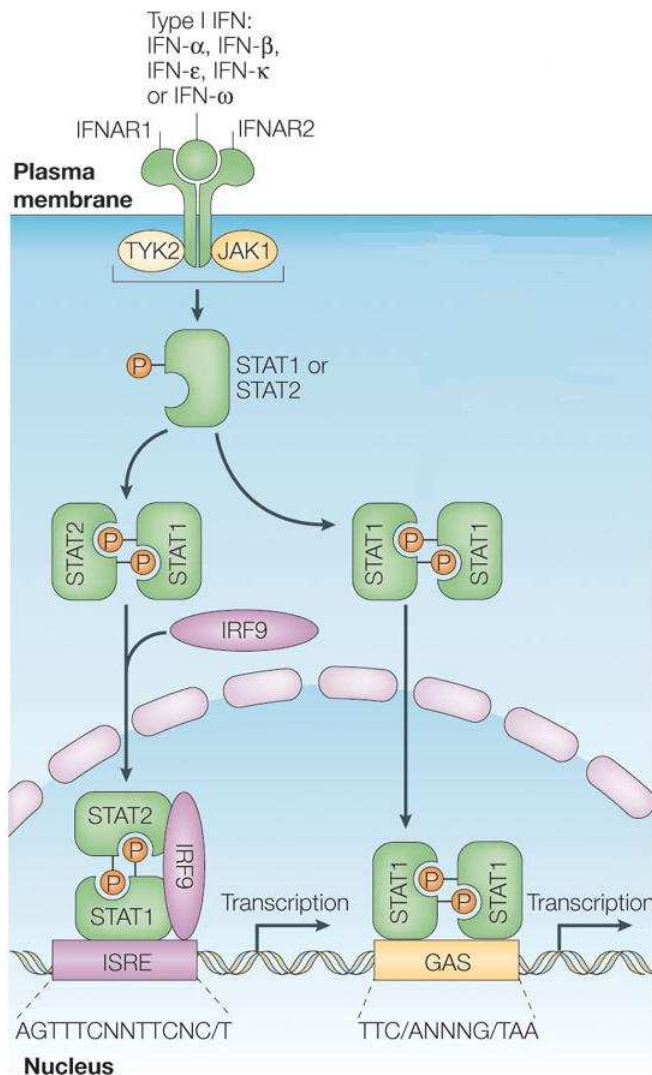


Abbildung 1.3 Typ I IFN Signalkaskade (verändert nach (158))

Durch die Bindung von Typ I IFN an seinen Rezeptor kommt es zur Aktivierung der Rezeptor-assoziierten Tyrosinkinasen JAK1⁸ und Tyk2⁹, welche STAT1 und STAT2 phosphorylieren. Die phosphorylierten STATs heterodimerisieren und translozieren in den Zellkern, wo sie mit dem DNA-bindenden Protein IRF9 interagieren. Dieser Komplex bindet an das IFN-stimulierte Antworelement (ISRE), wodurch es zur Transkription diverser Gene kommt. STAT1 kann nach Phosphorylierung auch homodimerisieren, so dass es im Zellkern an die IFN γ -aktivierte Stelle (GAS) bindet und die Transkription diverser Gene induziert.

Durch Aktivierung dieses Signalweges wird die Transkription mehrerer hundert Gene induziert, wodurch die virus-infizierte Zelle in einen antiviralen Zustand versetzt wird.

⁸ Janus activated kinase 1

⁹ Tyrosine kinase 2

1.1.1.3.1 Antiviraler Zustand

Nach Stimulation von Zellen mit IFN α/β kommt es zur verstärkten Expression diverser Gene (ISG, Interferon-stimulierte Gene), welche für Proteine kodieren, die eine antivirale Antwort vermitteln. Zu diesen Genen gehören z.B. Proteinkinase R (PKR), Oligoadenlyatsynthetase (OAS), Mx-Proteine, aber auch Proteine der Antigen-Prozessierungsmaschinerie, oder Faktoren, die den Zellzyklus stoppen. PKR erkennt dsRNA in einer virus-infizierten Zellen und wird durch diese aktiviert. Anschließend bindet die aktivierte PKR an den eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor 2 α (eIF2 α) und verhindert damit die Translation viraler und zellulärer Proteine. Zudem kann die Bindung an eIF2 α die Induktion der Apoptose auslösen, so dass virus-infizierte Zellen absterben und deren Inhalt degradiert wird.

OAS wird ebenfalls durch dsRNA aktiviert, was eine Oligomerisierung von ATP zur Folge hat, wodurch wiederum die RNase L aktiviert wird. RNase L degradiert zelluläre und virale RNA (205). Mx ist eine Guanosintriphosphatase, welche virale Ribonukleoproteine zu spezifischen Zellkompartimenten absondert (63).

Durch die Expression all dieser ISG können Viren in den infizierten Zellen nicht mehr replizieren. Zudem können proteasomal abgebaute virale Proteine besser auf der Oberfläche infizierter Zellen mittels MHC-I und MHC-II präsentiert werden, da auch die Induktion der Gene der Antigenprozessierung durch IFN α/β stimuliert wird. Dadurch können infizierte Zellen besser von zytotoxischen T-Zellen erkannt und eliminiert werden.

1.1.1.3.2 Strategien der viralen Immunevasion der Typ I Interferon-Antwort

Viele Viren haben Wege gefunden, die IFN α/β -Antworten zu blockieren, um sich vor einer Eliminierung durch das Wirts-Immunsystem zu schützen. Viren verfolgen zu diesem Zweck verschiedene Mechanismen (vergleiche Abbildung 1.4).

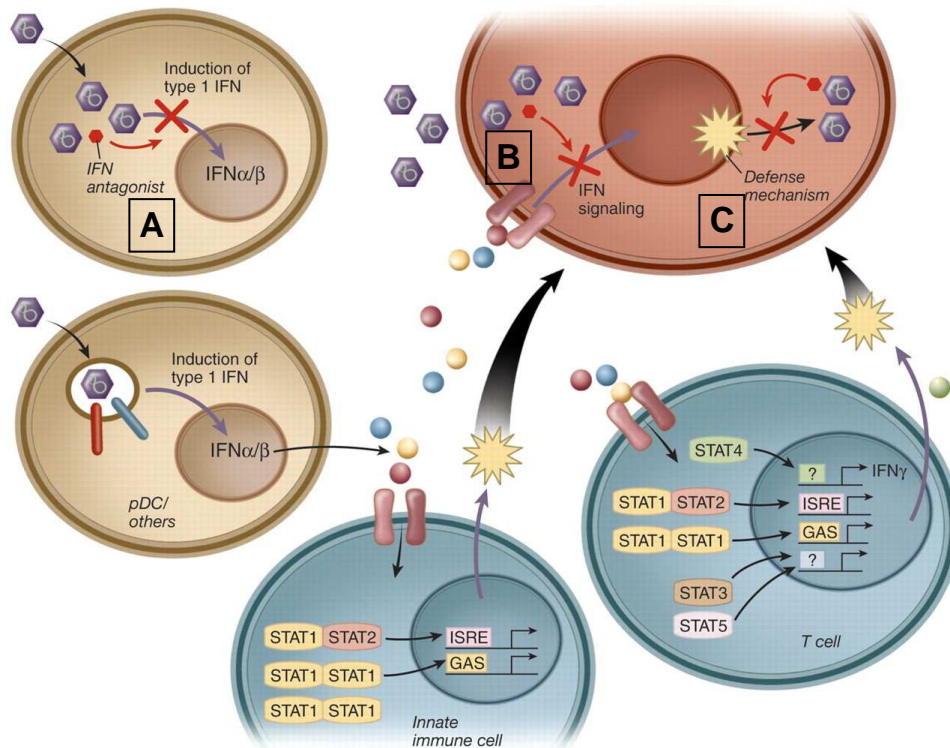


Abbildung 1.4 Diverse Strategien der Immunevasion von Viren (verändert nach (63))

Viren versuchen an vielen Stellen der Typ I IFN-Antworten zu intervenieren und die Wirtszellantwort zu inhibieren. Zum Einen kann die Typ I IFN-Induktion gehemmt werden (A), oder die Typ I IFN-Signalkaskade wird durch verschiedene Mechanismen von diversen Viren geblockt (B). Zum Anderen können die durch den Typ I IFN-Signalweg induzierten Gene und deren Produkte von Viren inhibiert werden (C).

Einerseits können Viren direkt mit der Genexpression und Proteinsynthese des Wirts interagieren (z.B. M-Protein von VSV, (55)). Andere Viren wie z.B. das Reovirus oder das Vacciniavirus (VACV) kodieren für Proteine, die an ihre eigene dsRNA binden und verhindern so die Aktivierung von PKR oder OAS (31, 93). Es gibt auch Viren, die an unterschiedlichen Punkten der IFN α/β -Induktion intervenieren (siehe Abbildung 1.4.A). So blockieren das Hepatitis C Virus (HCV, (123)) und das VACV (77) die TLR3-Signalkaskade durch Spaltung von TRIF, wohingegen das Herpes Simplex Virus (HSV, (124)) und das Humane Herpes Virus-6 (98) IRF-3 inhibieren. Ein weiterer Angriffspunkt viraler Evasion ist der IFN α/β -Signalweg (siehe Abbildung 1.4.B). Das SeV induziert die Degradation von STAT1 (64), das humane Cytomegalievirus (134) interagiert mit Jak-Kinasen und Adenoviren (AdV) inhibieren IRF9 (121). Ein anderer Evasionsmechanismus ist die Inhibition von IFN-induzierten antiviralen Enzymen wie OAS und PKR (siehe Abbildung 1.4.C). So produzieren z.B. AdV kurze hoch-strukturierte RNA-Moleküle, welche an PKR binden und deren Dimerisierung verhindern (106). Proteine von HCV und HSV hingegen binden direkt

an PKR und blockieren diese (62, 160) und das Poliovirus kodiert für ein Protein, welches direkt PKR degradiert (22).

Durch die verschiedenen Evasionsstrategien der Viren kommt es bei vielen Infektionen zu gehemmten IFN α / β -Antworten, wie z.B. auch bei retroviralen Infektionen (67, 86, 100).

1.1.1.3.3 Immunomodulatorische Eigenschaften von IFN α / β

Neben der Induktion von antiviralen Enzymen und einer verbesserten Antigenprozessierung und Präsentation kann Typ I IFN auch direkt auf Zellen des Immunsystems wirken und deren biologische Funktionen verändern. Typ I IFN reguliert z.B. die Zytotoxizität von NK-Zellen und deren Proliferation (20, 141, 167, 190). IFN α / β kann direkt die Expression von Perforin induzieren und somit die zytotoxische Aktivität von NK und CD8⁺ T-Zellen regulieren (11, 190). Außerdem erhöht Typ I IFN im Falle von NK-Zellen die Produktion und Sekretion anderer Zytokine wie z.B. IFN γ , das wiederum autokrin wirkt und weitere Zytokine induziert (141, 167). Eine weitere modulatorische Eigenschaft von Typ I IFN ist die Reifung von myeloiden DC und deren erhöhte Kreuzpräsentation von phagozytierten viralen Antigenen über MHC-I für CD8⁺ T-Zellen (115, 171). Auch induziert IFN α / β die Expression des Chemokinrezeptors CCR7 auf der Oberfläche von myeloiden DC, so dass diese in T-Zellbereiche der lymphatischen Organe migrieren (120). Des Weiteren kommt es nach Typ I IFN-Stimulation zur Expression von IL-15 in DC, welches kritisch für die Proliferation und das Überleben von NK-Zellen ist (196). In einer Infektion von Mäusen mit dem Lymphozytären Choriomeningitis-Virus (LCMV) wurde außerdem gezeigt, dass IFN α / β für eine optimale klonale Expansion von CD8⁺ T-Zellen und zur Generierung von Gedächtniszellen nötig ist (3, 107).

1.1.2 Das adaptive Immunsystem

Die erworbene Immunität passt sich spezifisch an die jeweilige Pathogene an und wird durch die Zellpopulation der Lymphozyten vermittelt. Diese Antigen-spezifischen Zellen sind in der Lage, verschiedene Effektorfunktionen im Kampf gegen eine Infektion sowie ein immunologisches Gedächtnis auszubilden. Die Lymphozyten befinden sich in großer Anzahl im Blut, in der Lymphe und in den lymphatischen Organen. Es werden zwei Gruppen von Lymphozyten unterschieden, die T-Zellen und die B-Zellen. Die B-Zellen entwickeln sich direkt aus den hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks, während die T-Zellen von der fötalen Leber bzw. vom Knochenmark in den Thymus wandern und dort ausreifen (70).

Die beiden unterschiedlichen Typen von Lymphozyten spiegeln zwei Hauptmechanismen der adaptiven Immunantwort wider, die humorale und die zelluläre Immunantwort. B-Zellen produzieren abhängig oder unabhängig von T-Zellen Antigen-spezifische Antikörper (Immunglobuline, Ig), die zur humoralen Immunantwort zählen. Menschen, die keine T-Zellen besitzen, weisen eine geringere Antikörperantwort auf (71). Dieses Phänomen beruht auf der Funktion einer Subpopulation von T-Zellen, die die Aktivität von Effektorzellen regulieren, so z.B. auch von B-Zellen. Daher bezeichnet man diese als T-Helferzellen (Th-Zellen). Auf ihrer Oberfläche exprimieren T-Zellen bestimmte Oberflächenmoleküle. Diese zellulären Proteine werden mit der Abkürzung CD (*clusters of differentiation*) und einer entsprechenden Zahl bezeichnet. CD4- und CD8-Moleküle sind Glykoproteine, die zur Ig-Superfamilie gehören und als Ko-Rezeptoren des T-Zellrezeptors (TCR) fungieren. Das CD4-Molekül findet sich üblicherweise auf T-Helferzellen. Es stellt einen Ko-Rezeptor für MHC-II restringente Antigen-induzierte T-Zellaktivierung dar. Zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) hingegen sind durch die Expression des CD8-Ko-Rezeptors charakterisiert, welcher spezifisch an das MHC-I-Protein bindet (154).

1.1.2.1 Die zelluläre Immunantwort

1.1.2.1.1 T-Helferzellen

T-Helferzellen reagieren auf Antigene, die ihnen auf MHC-II-Molekülen präsentiert werden (108). Dies erfolgt mit Hilfe des TCR und dem Ko-Rezeptor CD4. MHC-II-Moleküle werden ausschließlich von APC, wie DC, Makrophagen und B-Lymphozyten exprimiert. Durch die Erkennung und Bindung des körperfremden Antigens kommt es zur Aktivierung der Th-Zelle. Die Antigen-spezifische T-Helferzell-

Antwort wird in Typ 1- (Th1) und Typ 2- (Th2) Reaktionen, unterteilt (174). Th1-Zellen sekretieren Zytokine wie IL-2 und IFN γ . Diese aktivieren Makrophagen und CD8⁺ T-Zellen, so dass eine zelluläre Immunantwort eingeleitet wird. Th2-Zellen hingegen produzieren IL-4, -5, -10 und -13 und hemmen so die Makrophagenaktivität. Die Kennzeichen einer Th2-assoziierten Immunantwort sind die hohe Konzentration an IL-4 und der Immunglobulin-Switch von IgM zu IgG1 in B-Zellen (182). Da die Immunantwort in diesem Fall über Antikörper vermittelt wird, bezeichnet man dies als humorale Immunantwort. Eine Th1-dominierte Immunantwort wird vor allem bei einer Infektion mit Viren oder intrazellulären Bakterien beobachtet. Bei einer Infektion mit Würmern oder extrazellulären Bakterien dominiert die Th2-Immunantwort (142).

1.1.2.1.2 Zytotoxische T-Zellen

Zytotoxische CD8⁺ T-Zellen erkennen virale Peptide in Verbindung mit MHC-I-Molekülen (206). Diese werden von jeder kernhaltigen Zelle exprimiert. Eine wichtige Aufgabe aktivierter CD8⁺ T-Zellen besteht in der Erkennung und Eliminierung virus-infizierter Zellen, die MHC-I-Moleküle in Verbindung mit viralen Peptiden auf ihrer Oberfläche präsentieren. Neben ihrer zytotoxischen Funktion haben CD8⁺ T-Zellen durch die Freisetzung verschiedener Zytokine und Chemokine auch einen regulativen Charakter im Immunsystem. Zytotoxische CD8⁺ T-Zellen sind in der Lage, IFN γ und auch TNF α , sowie diverse Chemokine zu synthetisieren, z.B. *Macrophage Inflammatory Protein-1* (MIP-1 α , MIP-1 β) oder *Regulated on Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted* (RANTES) (162). Chemokine spielen eine entscheidende Rolle bei der Migration von Leukozyten zum Ort einer Infektion und der Induktion von Entzündungsprozessen in infizierten Organen (126).

Über indirekte und direkte Mechanismen kann IFN γ die Vermehrung von Pathogenen hemmen, indem es eine gesteigerte MHC-I Expression induziert (61), Makrophagen aktiviert (161) oder die Pathogenreplikation inhibiert (72). Außerdem erhöht IFN γ die Fas-Expression und wirkt dadurch indirekt auf die Apoptose-Induktion von infizierten Zellen (144). TNF α besitzt eine starke proinflammatorische Wirkung und ein direktes lytisches Potential. Die Bindung von TNF α an den TNF-Rezeptor 1 induziert den Zelltod der infizierten Zelle (195). Außerdem verfügen CTL über zwei unabhängige zytolytische Mechanismen: die Granula-Exozytose und die FasL/Fas vermittelte Zytotoxizität. Beide voneinander unabhängigen zytotoxischen Wege führen zur Apoptose der Zielzelle. Durch die Exozytose von zytotoxischen Granula der CTL, welche mit Proteasen (Granzyme), lytischen Molekülen (Perforin), Zytokinen (TNF α)

und verschiedenen Rezeptoren (Mannose-6-Phosphat-Rezeptor) gefüllt sind (201), gelangt deren zytotoxischer Inhalt in den interzellulären Spalt zwischen CTL und Zielzelle und induziert so die Apoptose in der Zielzelle. Für die induzierte Apoptose sind im wesentlichen Perforin sowie Granzym A und Granzym B verantwortlich. Granzym A gelangt nach der Freisetzung durch Perforin, welches in der Kernmembran Poren bildet, in den Nukleus und induziert dort die Apoptose. GzmB aktiviert hauptsächlich verschiedene Caspase-Kaskaden, was ebenfalls die Induktion der Apoptose zur Folge hat.

Der weitere Mechanismus der T-Zell vermittelten Zytotoxizität wurde in $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen sowie ebenfalls in NK-Zellen gefunden. Hierbei vermitteln die T- und NK-Zellen die zytotoxische Aktivitäten über den Fas/Fas-Ligand-Mechanismus (180). Beim Antigenkontakt der CTL mit der infizierten Zelle bindet der FasL auf der Oberfläche der CTL an das Fas welches von der Zielzelle exprimiert wird. Durch diese Interaktion kommt es zur Aktivierung von Caspasen, was folglich zur Induktion der Apoptose in der infizierten Zelle führt (146).

1.2 Retroviren

Die Familie der Retroviren ist dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Reverse Transkriptase für die Replikation ihres RNA-Genoms benötigt (12, 187). Retroviren sind in drei Unterfamilien eingeteilt: Onkoviren, Lentiviren und Spumaviren. Die Onkoviren werden wiederum in 5 verschiedene Gattungen (α , β , γ , δ , ϵ -Retrovirus) eingeteilt. Weiterhin unterscheidet man die Retroviren anhand der Komplexität ihres Genoms in einfache und komplexe Retroviren, wie in Abbildung 1.5 zu erkennen ist.

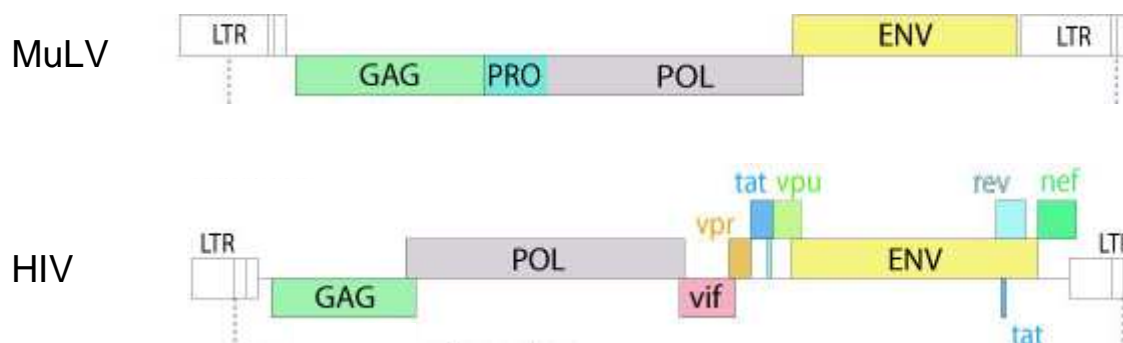


Abbildung 1.5 Aufbau eines einfachen und komplexen retroviralen Genoms am Beispiel von MuLV und HIV (verändert nach <http://expasy.ch/viralzone>)

Der Aufbau von einfachen Retroviren am Beispiel von MuLV und der Aufbau von komplexen Retroviren am Beispiel von HIV. Die Gene *gag*, *pol* und *env* kodieren für alle Strukturproteine. Diese sind essentiell und in allen Retroviren vorhanden. Die Gene *vif*, *vpr*, *vpu*, *rev*, *tat* und *nef* kodieren für akzessorische und regulatorische Proteine

Einfache Retroviren, wie α -, β - und γ -Retroviren besitzen nur die Strukturgene *gag* (*group-specific antigen*), *pol* (Polymerase) und *env* (*envelope*), wohingegen komplexe Retroviren, wie die Lenti- und Spumaviren oder auch die δ - und ϵ -Retroviren, für weitere zahlreiche regulatorische und akzessorische Proteine kodieren. Ein weiteres Merkmal der Retroviren ist deren Integration ins Wirtszellgenom. Das so entstandene Provirus wird dann mittels zellulärer Polymerasen transkribiert. Nach Infektion einer somatischen Zelle mit einem Retrovirus kommt es zur aktiven Verbreitung des Virus, indem es den kompletten Infektionszyklus mit anschließender Partikelfreisetzung durchläuft. Durch Gendefekte und Deletionen im Provirus kann es aber dazu kommen, dass dieses nur noch vertikal übertragen wird und keinen Infektionszyklus mehr durchläuft. In diesem Fall handelt es sich dann um endogene Retroviren. Diese können über längere Zeiträume im Genom verbleiben, weswegen das menschliche Genom zu etwa 8% aus endogenen Retroviren besteht (116).

1.2.1 Aufbau von Retroviren

Die Familie der Retroviren besteht aus großen umhüllten Viren (80-100 nm im Durchmesser), mit einem linearen, (+) ssRNA-Genom mit einer Größe zwischen 7-12 kb. Das Nukleokapsid besteht aus den Kapsidproteinen, 2 diploiden ssRNA-Strängen, der Integrase und der Reversen Transkriptase. Dieses wird wiederum wie in Abbildung 1.6 zu sehen von Matrixproteinen und einer Lipiddoppelschicht umgeben.

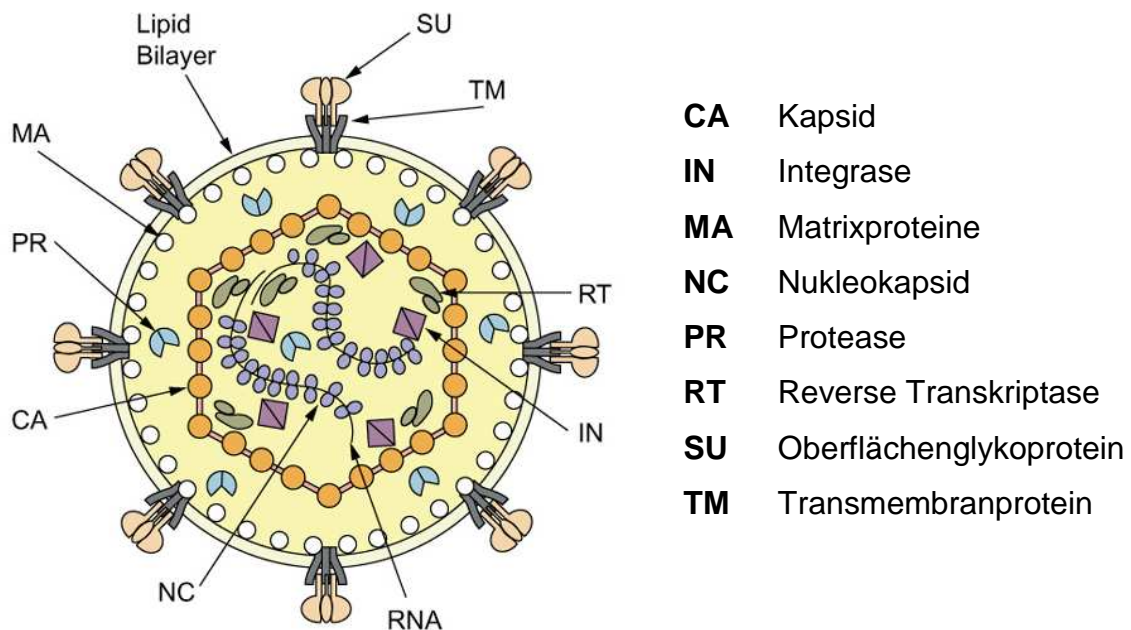


Abbildung 1.6 Struktureller Aufbau von Retroviren (37)

Wie bereits erwähnt, besitzen alle Retroviren die 3 Strukturgene *gag*, *env* und *pol*. *Gag* kodiert für interne Strukturproteine wie Matrix, Kapsid und Nukleoproteine. Das *pol*-Gen enthält die Informationen für die Enzyme Integrase und Reverse Transkriptase und das *env*-Gen für die Oberflächen- und Transmembran-Komponenten des viralen Hüllproteins. Außerdem besitzen alle Retroviren eine kleine Domäne, das *pro*-Gen, welches die Virusprotease synthetisiert. All diese Gene befinden sich zwischen zwei 200-600 bp langen DNA-Wiederholungseinheiten (*long terminal repeats*, LTR). Diese Einheiten flankieren die Gene und befähigen diese nach dem Herausschneiden zur Reintegration in das Genom. Da sie alle Sequenzen enthalten, die zur Regulierung der Genexpression notwendig sind (wie z.B. Enhancer, Promoter und Polyadenylierungssignal), steuern bzw. terminieren sie die Transkription.

1.2.2 Replikationszyklus von Retroviren

Die Replikation von Retroviren lässt sich in mehrere Schritte unterteilen (siehe Abbildung 1.7). Zu Beginn findet die Adsorption an die Wirtszelle statt, indem das Glykoprotein der Virushülle an einen Rezeptor an der Wirtszelloberfläche bindet (1.). Dann beginnt die virale Membran mit der Wirtszellmembran zu fusionieren, damit das Kapsid in das Zytoplasma der Wirtszelle gelangen kann (2.). Anschließend löst sich das Kapsid auf, und die RNA sowie verschiedene virale Proteine werden freigesetzt, z.B. die Reverse Transkriptase und Integrase. Nach Aktivierung der Reversen Transkriptase wird die ssRNA in dsDNA umgeschrieben (3.), die anschließend mit Hilfe sowohl zellulärer als auch viraler Proteine in den Zellkern transportiert (4.) und mit Hilfe der Integrase in das Wirtszellgenom eingebaut wird (5.). Im Folgenden werden die RNA-Polymerase II und verschiedene andere Transkriptionsfaktoren der Wirtszelle rekrutiert, um die DNA des Provirus zu transkribieren (6.). Die durch diesen Prozess entstandene mRNA wird dann ins Zytoplasma transportiert, in dem auch die Translation der viralen Proteine stattfindet (7.). Im Anschluss daran werden an der Zellmembran die neuen Viruspartikel verpackt. Dazu werden die viralen *env*-Proteine, welche nach der Translation auf der Plasmamembran sitzen, und die entstandene virale RNA zu kompletten Viren verpackt und umgehend als neue virale Partikel freigesetzt (8.). Hierbei wird ein Teil der Plasmamembran abgeschnürt und dieser wird zur neuen Lipiddoppelschicht des neuen viralen Partikels mit den enthaltenen *env*-Proteinen. Dieser Prozess wird auch als „*Budding*“ bezeichnet.

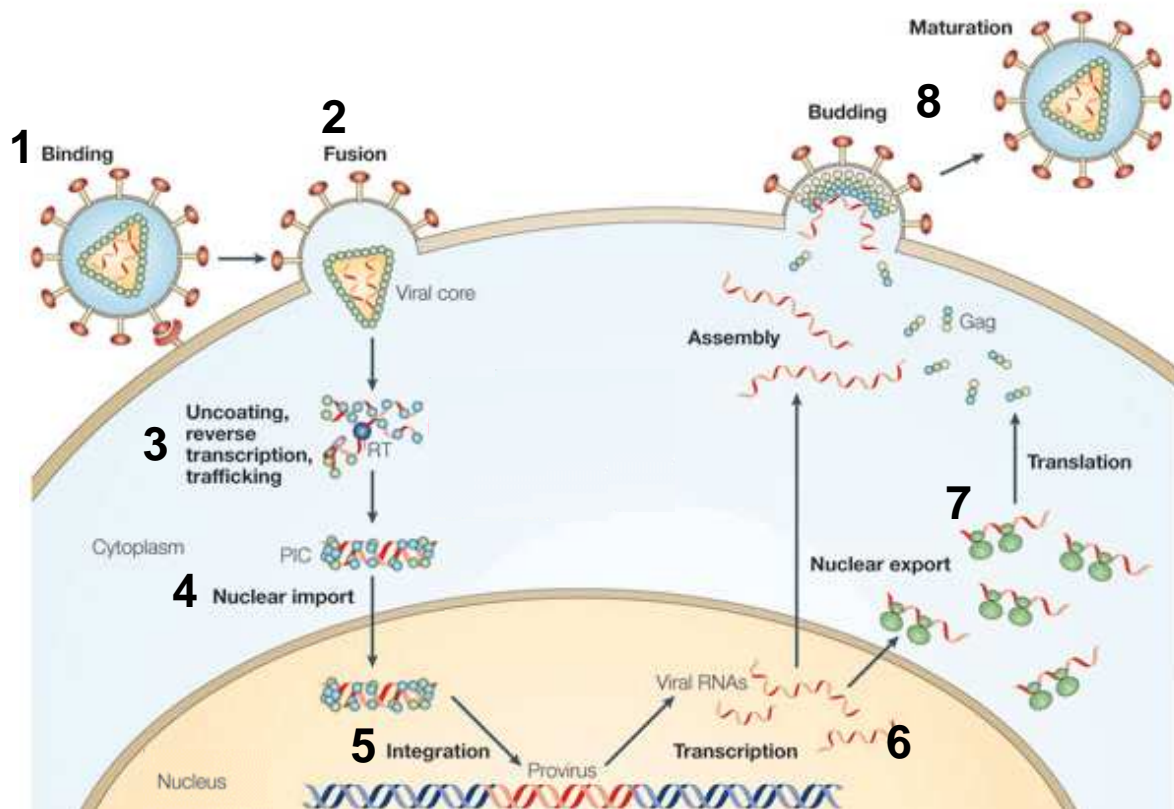


Abbildung 1.7 Replikationszyklus von Retroviren (verändert nach (151))

1. Bindung des Viruspartikels an einen spezifischen Rezeptor an der Oberfläche der Wirtszelle
2. Fusion des Viruspartikel mit der Zellmembran und Internalisierung des Viruskapsids ins Zytoplasma
3. Reverse Transkription
4. Transport der synthetisierten dsDNA in den Zellkern
5. Integration der viralen dsDNA ins Wirtsgenom (Provirus)
6. Transkription des Provirus
7. Transport viraler mRNA ins Zytoplasma und Translation dieser
8. Verpackung der viralen RNA und der viralen Proteine (*Assembly*) und anschließende Freisetzung von neuen Viruspartikeln (*Budding*)

1.2.3 HIV

Im Jahre 1981 wurde in einer amerikanischen Fachzeitschrift des CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) von 5 jungen Männern berichtet, welche an einer seltenen Lungenentzündung erkrankt waren (*Pneumocystis carinii*). Dies war die erste Berichterstattung der später bekannten AIDS-Erkrankung (erworbenes Immundefektsyndrom). Zwei Jahre später gelang es den Forschern Barre-Sinoussi, Chermann und Montagnier ein bis dahin unbekanntes humanes Retrovirus zu isolieren (15), welches später mit AIDS in Verbindung gebracht wurde (27). Das

Isolat von Barre-Sinoussi (15), sowie weitere Isolate (122, 159) wurden später unter der Bezeichnung "Humanes Immundefizienzvirus Typ 1" (HIV-1) zusammengefasst. Inzwischen ist HIV-1 global verbreitet und mehr als 33 Millionen Menschen sind weltweit mit dem Virus infiziert (Stand November 2009 (191)). Nach der Entdeckung von HIV begannen sofort die ersten Studien zur Entwicklung eines Impfstoffes. Dennoch vermittelt keine der bis heute entwickelten Prototyp-Vakzinen einen Schutz vor der HIV-Infektion. Die „*Highly Active Antiretroviral Therapy*“, die zur Zeit die einzig wirksame antiretrovirale Therapie dargestellt, ist außerdem durch ihre hohen Kosten nur einem geringen Teil der Weltbevölkerung zugänglich (ca. 5% der HIV-Infizierten). Bei dieser Therapie handelt es sich um eine Kombinationstherapie mit Arzneimitteln aus verschiedenen Wirkungsklassen wie z.B. nukleosidische Reverse Transkriptase Inhibitoren, nicht-nukleosidische Reverse Transkriptase Hemmer oder Proteasehemmer. Die Nachteile dieser Therapie sind die Kosten, die starken Nebenwirkungen der Präparate und die trotz Kombinationstherapie auftretende Resistenzbildung des HIV. Zudem kann durch diese Therapie nur die Entwicklung von AIDS verzögert werden, eine vollständige Elimination des Virus ist dagegen nicht möglich.

1.2.4 Tiermodelle für retrovirale Infektionen

Ein Problem, das die Forschung mit HIV-1 schwierig macht, ist die begrenzte Anzahl an aussagekräftigen Tiermodellen. Reproduzierbar lassen sich nur Schimpansen mit HIV-1 infizieren. Allerdings replizieren die meisten HIV-1 Virusisolate in Schimpansen sehr schlecht und eine AIDS-ähnliche Erkrankung entwickelt sich eher selten (152, 153). Außerdem sprechen ethische und finanzielle Gründe gegen Experimente mit Schimpansen. Daher wurden zahlreiche Studien zur Untersuchung der Immunantwort gegen Retroviren in Rhesusmakaken mit dem verwandten Simianen Immundefizienzvirus (SIV) durchgeführt. Probleme bei diesem Tiermodell sind die limitierte Anzahl an Affen, ihr heterologer genetischer Hintergrund, das geringe Wissen über die molekulare Immunologie von Affen und die stark limitierten Möglichkeiten, deren Immunsystem zu manipulieren. Daher sind Erkenntnisse über die Grundlagen der Retrovirusimmunologie in einem Mausmodell wesentlich einfacher zu erlangen. Ein Vorteil des Mausmodells ist der genetisch definierte immunologische Hintergrund der Tiere, wobei kongene, transgene und knockout-Tiere von besonderer Bedeutung für aussagekräftige Experimente sind.

Weil Mäuse nicht mit HIV oder SIV infiziert werden können, benötigt man jedoch ein anderes Retrovirus. Es gibt eine große Anzahl onkogener Retroviren in der Maus, jedoch induzieren sehr viele dieser Retroviren nur bei neugeborenen Mäusen eine Erkrankung, während sie bei erwachsenen Tieren apathogen sind. Das Friend Virus (FV) ist ein Retrovirus-Komplex, der in erwachsenen Mäusen eine letale Erythroleukämie verursacht. Die immunologischen und genetischen Merkmale des FV sind in den letzten 25 Jahren intensiv untersucht worden (81). Bedingt durch die unterschiedliche Pathogenese von FV in der Maus im Gegensatz zu HIV oder SIV im Menschen oder Affen ist die FV-Infektion als Modell für pathologische Aspekte der HIV-Infektion nicht geeignet. Allerdings sind in der akuten Phase einer FV-Infektion bzw. HIV- oder SIV-Infektion große Ähnlichkeiten in der Auseinandersetzung des Immunsystems mit dem jeweiligen Virus zu beobachten (48). Daher lassen sich die immunologischen Merkmale einer retroviralen Infektion gut am FV-Modell untersuchen. Das Friend Virus Mausmodell wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet, um Immuntherapien gegen Retroviren zu entwickeln und diese in ihren immunologischen Mechanismen genau zu untersuchen.

1.2.5 Pathogenese des Friend Virus Komplexes

Der Friend Virus-Komplex (FV) besteht aus dem pathogenen replikationsunfähigen SFFV (*spleen focus forming virus*) und dem replikationskompetenten aber apathogenen F-MuLV (Friend Murines Leukämievirus). Das SFFV besitzt größere Deletionen im *gag*-Gen, womit es dem Virus nicht möglich ist, virale Partikel zu bilden. Erst eine Koinfektion einer Wirtszellen durch beide Viren (F-MuLV und SFFV) führt zur Verpackung der RNA von SFFV in F-MuLV kodierte Viruspartikel und somit zur Verbreitung des SFFV. Durch diese Verbreitung des SFFV wird in Mäusen eine Erythroleukämie verursacht. F-MuLV alleine ist in adulten Mäusen apathogen, kann aber in neugeborenen Mäusen, die noch kein voll ausgebildetes Immunsystem haben, eine Splenomegalie, Anämie und Erythroleukämie verursachen (60). Der Rezeptor für F-MuLV und andere ekotrophe murine Leukämieviren ist Pit-1/2 (*inorganic phosphate transporter*) (46). Die Zielzellen sind Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten und Erythrozytenvorläuferzellen (50). Der Rezeptor für das SFFV ist unbekannt.

Der Ablauf der Pathogenese lässt sich wie folgt gliedern. Zuerst infiziert das SFFV Erythroblasten, woraufhin das *env*-kodierte Glykoprotein gp55 an der Zelloberfläche

exprimiert wird. Dieses Glykoprotein bindet an den Erythropoetin-Rezeptor von kernhaltigen Erythrozytenvorläuferzellen, wodurch es ein konstitutives Mitogen für diese Zellen darstellt und eine polyklonale Proliferation induziert (43, 99). Durch dieses falsche Proliferationssignal werden die Zielzellen für das FV, die Erythrozytenvorläuferzellen, zur Proliferation angeregt und bilden somit ein Virusreservoir. Die Expression von gp55 und die Aktivierung des Erythropoetin-Rezeptors reichen nicht für eine maligne Transformation der Zellen aus. Als nächstes erfolgt die Integration ins Wirtszellgenom (Provirus). Das SFFV integriert in 95% aller FV-transformierten Zellen in denselben Locus: *spi-1* (*SFFV proviral integration site-1*) (139, 140). Dies führt zur Aktivierung und Überexpression des Transkriptionsfaktors PU.1, ein Transkriptionsfaktor der *ets*-Familie, der für die Entwicklung lymphatischer und myeloider Zellen von Bedeutung ist (101). Die Überexpression von PU.1 verursacht die Hemmung der Differenzierung von Erythrozyten-Vorläuferzellen. In einem weiteren Schritt kommt es dann zur Inaktivierung des Tumorsuppressor-Gens p53 (99). Dies ermöglicht den transformierten Zellen weiter ungehindert zu proliferieren. Suszeptible Mäuse z.B. Balb/c entwickeln daraufhin eine massive Splenomegalie, bei der das Milzgewicht auf das zehn- bis zwanzigfache des Normalgewichts ansteigen kann. Das Immunsystem dieser Mäuse ist nicht in der Lage, eine schützende Immunantwort gegen das FV auszubilden, so dass die Tiere 3-4 Wochen nach Infektion eine maligne Erythroleukämie entwickeln (138).

1.2.6 Immunität gegen eine Friend Virus-Infektion

Ob ein Mausstamm nach der Infektion mit FV eine maligne Erythroleukämie entwickelt (FV-suszeptibler Mausstamm) oder das Virus nach einer vorübergehenden Splenomegalie kontrolliert werden kann (FV-resistenter Mausstamm), ist abhängig von der Virusdosis und dem genetischen Hintergrund der infizierten Maus.

Die Resistenz gegen FV wird durch eine Reihe von Genen vermittelt. Es gibt mindestens sechs Gene (Fv 1-6), die eine Resistenz auf nicht-immunologischer Grundlage induzieren (183) und mindestens vier Gene des MHC (in der Maus als H-2 bezeichnet), die die zelluläre und humorale Immunantwort gegen das FV beeinflussen. So sind C57BL/6 Mäuse, die den H-2^b Haplotyp tragen, resistent gegen eine FV-induzierte Erythroleukämie, während z.B. B10A Mäuse mit einem H-2^a Haplotyp suszeptibel sind. Hinzu kommt, dass C57BL/6 Mäuse noch das nicht

immunologische Resistenzgen Fv-2 tragen, welches die polyklonale Zellaktivierung von Erythrozytenvorläuferzellen und die damit verbundene Splenomegalie limitiert (89).

Zwischen den Mausstämmen mit dem H-2^b und dem H-2^a Haplotyp lässt sich ein kongener Mausstamm einordnen, welcher suszeptibel für eine FV-induzierte Leukämie ist. Dieser entsteht aus der Verpaarung von A.BY x B10A Mäusen (F1: Y10A-Mäuse), dessen Nachkommen den Genotyp H-2^{a/b} besitzen.

Die H-2 Gene sind wichtig für die Präsentation von viralen T-Zell-Epitopen. Der immunologische Schutz vor einer FV-induzierten Erythroleukämie in FV-resistenten Mäusen wird durch eine Kombination von FV-spezifischen CTLs, T-Helferzellen und neutralisierenden Antikörpern vermittelt. Nur ein Bestandteil der Immunantwort (z.B. CTLs) reicht nicht aus, um einen Schutz zu erzeugen. So führt eine Depletion von z.B. CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen in FV-resistenten Mäusen dazu, dass das Immunsystem dieser Tiere nicht mehr in der Lage ist, das Virus zu kontrollieren. Die Tiere erkranken, wie FV-suszeptible Mäuse, an einer Erythroleukämie.

Entscheidend für den Schutz vor einer Erythroleukämie ist neben der Anzahl an spezifischen T-Zellen und B-Zellen auch die Kinetik der spezifischen Immunantwort. So können T-Zellantworten in FV-infizierten Mäusen mit dem Haplotyp H-2^{a/b} erst später als in FV-infizierten Mäusen mit H-2^{b/b} detektiert werden. Durch die verzögerte und schwächere Immunantwort in FV-suszeptiblen Mäusen kann sich das Virus initial stark vermehren, bevor das Immunsystem die Virusinfektion kontrollieren kann. Die Virus-induzierte Erkrankung ist zu diesem Zeitpunkt schon so weit vorangeschritten, dass ein vom Immunsystem vermittelter Schutz nicht mehr aufgebaut werden kann.

1.2.6.1 Krankheitsverläufe verschiedener Mausstämmen nach Friend Virus-Infektion

Der Krankheitsverlauf einer Maus nach FV-Infektion lässt sich anhand der Vergrößerung der Milz (Splenomegalie) verfolgen. Die Viruslast in der Milz korreliert mit der Milzgröße, so dass anhand dieser Rückschlüsse über die Schwere der FV-induzierten Erkrankung gezogen werden kann. Dabei wird die Schwere der Splenomegalie in verschiedene Stufen eingeteilt (siehe Abbildung 1.8). So beschreibt die Milzgröße 1 die Milz einer uninfizierten Maus mit einem Milzgewicht zwischen 0,1 und 0,2 g wieder. Die Einteilung der Milzgrößen 2-4 stellt die verschiedenen Stadien der Splenomegalie nach FV-Infektion dar.

STATUS	uninfected	splenomegalic			recovered
RATING	1+	2+	3+	4+	1r
WEIGHT (grams)	0.12	0.42	0.96	1.89	0.20

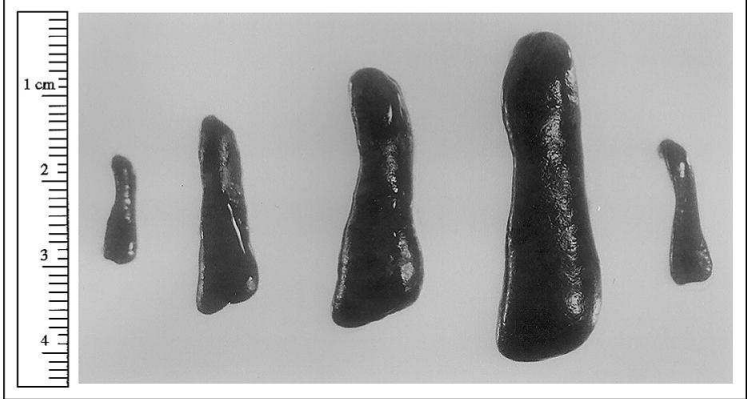


Abbildung 1.8 Einteilung der unterschiedlichen Stadien der Milzgröße nach FV-Infektion (verändert nach (80))

Die Milz einer uninfizierten Maus mit etwa 0,1-0,2 g ist als Milzgröße 1 definiert. Die Einteilung der Milzgrößen 2-4 stellt die verschiedenen Stadien der Splenomegalie nach FV-Infektion dar. Dabei entspricht die Milzgröße 2 einem Gewicht von 0,4 bis 0,8 g. Bei einem Milzgewicht von 0,8 -1,6 g spricht man von der Größe 3 und die Milzgröße 4 beschreibt ein Milzgewicht ab 1,6 g. Die Milzgröße 1r ist bezeichnend für eine persistierend infizierte Maus mit einem Milzgewicht zwischen 0,2 – 0,4 g.

Eine Milzvergrößerung bis zu zwei Wochen nach Infektion wird als Splenomegalie definiert, welche durch die initiale polyklonale Erythroblastenproliferation entsteht. Bei einer Milzgröße von 3-4 treten etwa 4 Wochen nach Infektion FV-transformierte Zellen auf, so dass dann von einer Erythroleukämie gesprochen werden kann. Tiere, welche zu diesem Zeitpunkt eine Milzgröße von 3-4 aufweisen, würden in der Regel an den Folgen der Erythroleukämie frühestens 10 Wochen nach FV-Infektion sterben. Ist bei den FV-infizierten Tieren zum Zeitpunkt 4 Wochen nach Infektion eine Milzgröße kleiner 2 nachweisbar, so sind diese Mäuse nicht an einer Erythroleukämie erkrankt. Diese Mäuse haben eine normale Lebenserwartung, sind aber chronisch mit FV infiziert.

Im folgenden Abschnitt werden die Krankheitsverläufe nach FV-Infektion des suszeptiblen und resistenten Mausstamms, welche in dieser Arbeit verwendet wurden, näher beschrieben.

C57BL/6 (H-2^{b/b}):

Die Infektion von C57BL/6-Mäusen mit einer hohen Dosis von FV (20.000 SFFU; *spleen focus forming units*) induziert in den ersten zwei Wochen eine leichte Splenomegalie (etwa doppeltes Milzgewicht im Vergleich zu naiven Mäusen), die

sich danach wieder zurückbildet. Die C57BL/6-Mäuse sind in der Lage, das Virus über das nicht-immunologische Fv-2 Gen und ihre effiziente FV-spezifische Immunantwort (MHC H-2^{b/b}) zu kontrollieren. Die Tiere erkranken nicht an einer Erythroleukämie, bleiben aber lebenslang persistierend infiziert und haben eine normale Lebenserwartung.

Y10A-Mäuse (H-2^{a/b}):

Als Y10A wird die F1-Generation der Kreuzung von A.BY x B10A bezeichnet. Y10A-Mäuse besitzen einen H-2^{a/b} Haplotyp. Y10A-Mäuse entwickeln zu >95% eine FV-induzierte Erythroleukämie 3 bis 4 Wochen nach Infektion mit einer hohen Virusdosis (>3000 SFFU), welche 10-12 Wochen nach Infektion tödlich verläuft (81, 137, 157). Allerdings werden die Mäuse spätestens 8 Wochen nach FV-Infektion getötet, um ein Leiden der Tiere zu verhindern. Aufgrund des heterozygoten H-2 Gens bildet sich die FV-spezifische Immunantwort sehr langsam und schwach aus. Dies verschafft dem Virus einen Vorsprung vor der spezifischen Immunantwort, so dass das Immunsystem bei einer hohen Infektionsdosis nicht mehr in der Lage ist, die Infektion zu kontrollieren.

1.3 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Die Induktion von Typ I Interferon ist meist die erste Immunantwort gegen Virusinfektionen. Typ I IFN hat eine direkte antivirale Aktivität, welche durch die Expression von antiviralen Enzymen wie Proteinkinase R und Oligoadenylatsynthetase vermittelt wird. Zusätzlich kann Typ I IFN auch modulatorische Eigenschaften auf Zellen des Immunsystems haben, wie die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen oder die Reifung von DC. Viele Viren inhibieren die Typ I IFN-Antwort durch diverse Mechanismen. In retroviralen Infektionen ist die Induktion von Typ I IFN sehr schwach. Daher liegt eine Möglichkeit von Immuntherapien während akuten viralen Infektionen in der exogenen Induktion von Typ I IFN mit Hilfe von TLR-Liganden. Der artifizielle TLR3-Ligand Poly I:C, welcher auch an die zytoplasmatische Helikase MDA5 bindet, induziert nach Applikation eine starke Typ I IFN-Antwort. Daher sollte in dieser Arbeit zunächst untersucht werden, ob Poly I:C während einer retroviralen Infektion antiviral wirkt. Dazu wurde in dieser Arbeit mit dem Friend Retrovirus Mausmodell gearbeitet, um die Wirkungsweise von Poly I:C in antiretroviralen Immuntherapien zu erforschen. Es sollten die genauen antiviralen Mechanismen untersucht werden, wie die direkte Inhibition der Virusreplikation und die Expression diverser antiviraler Proteine nach einer Therapie mit Poly I:C während einer akuten Friend Virus-Infektion. In einem weiteren Schritt sollten immunomodulatorischen Effekte von Poly I:C während einer akuten Friend Virus-Infektion untersucht werden. Es sollte analysiert werden, ob die Injektion von Poly I:C während einer akuten Friend Virus-Infektion eine modulatorische Wirkung auf diverse Immunzellen wie NK-Zellen, B-Zellen und T-Zellen hat. Diese Fragestellung sollte zunächst mittels Zell-Depletionsexperimenten während der Poly I:C-Therapie untersucht werden. Des Weiteren sollten die verschiedenen Lymphozytenpopulationen nach Poly I:C-Therapie *ex vivo* auf ihre Effektorfunktion untersucht werden. Außerdem sollte genauer betrachtet werden, welche verschiedenen IFN α -Subtypen durch Poly I:C induziert werden und die biologische Aktivität dieser Subtypen gegen FV sollte einzeln in *in vitro* und *in vivo* Versuchen bestimmt werden.

2 Material

2.1 Geräte

Tabelle 2.1 Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
Air Clean 600 PCR Workstation	STARLAB, Ahrensburg
Auflichtmikroskop CK2	Hund, Wetzlar
Auto MACS Pro	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CO ₂ Brutschrank	Thermo, Dreieich
Durchflusszytometer LSR II	Becton, Dickinson and Company (BD), Heidelberg
ELISA-Reader Expert Plus Microplate Reader	Biochrom, Cambridge (UK)
Gefrierschrank	LIEBHERR Comfort, Ochsenhausen
Heizblock	Grant, Cambridge (UK)
Kühlschrank	LIEBHERR Comfort, Ochsenhausen
Manuelle Pipetten (10, 20, 100, 200, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Nanodrop ND 2000	Peqlab, Erlangen
Neubauer-Zählkammer	BD, Heidelberg
Pipettierhilfe Accu-Jet Pro	Brand, Wertheim
Standgefrierschrank	SANYO, Wiesloch
Step One™ Real Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt
Waage Scout Pro	Ohaus, Kirchheim
Wärmelampen	Philips, Amsterdam
Werkbank	KOJAIR® Meckenheim
Werkbank Herasafe	Heraeus, München
Zentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Avanti J-26XPi	Beckman Coulter, Krefeld
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, München
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, München
Zentrifuge Rotina, 420	Hettich, Mülheim a.d.Ruhr

2.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 2.2 Verwendete Materialien

Material	Hersteller
Bechergläser	Schott, Mainz
Einmalspritzen, steril (2 ml)	BD, Heidelberg
Erlenmeyerkolben	Schott, Mainz
FACS-Röhrchen	BD, Heidelberg
Flachbodenplatte (96-well)	Greiner bio-one, Frickenhausen
G25-Kanüle, steril	BD, Heidelberg
<i>MicroAmp™ 48-Well Optical Adhesive Film</i>	Applied Biosystems, Darmstadt
<i>MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate</i>	Applied Biosystems, Darmstadt
Microtest™ Zellkulturplatte, steril (96-well)	Falcon BD, Heidelberg
Parafilm	American National Can, Chicago (USA)
Pinzetten	Braun, Tuttlingen
Pipetten, steril (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen (10, 20, 100, 200, 1000, 5000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen, steril (10, 20, 100, 200, 1000 µl)	STARLAB, Ahrensberg
PP-Schraubenverschlussröhrchen, steril (15 ml, 50 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Reaktionsgefäß (1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Scheren	Braun, Tuttlingen
Zellkulturflaschen, steril (T25, T75, T175)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellkulturplatte, steril (6-well, 12-well, 24-well)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellsiebe	Falcon BD, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen	Nalgene, Thermo Fisher Scientific, Rochester (USA)

2.3 Versuchstiere

2.3.1 Wildtyp Mäuse

Balb/c :	Resistenzgene: H-2D ^{d/d} , Fv-2 ^{s/s} Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln, Deutschland
C57BL/6:	Resistenzgene H-2D ^{b/b} , Fv-2 ^{r/s} Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln, Deutschland
(C57BL/10AxA.BY), F1 (Y10A):	Resistenzgene: H-2D ^{a/b} , Fv-2 ^{r/s} eigene Zucht, Zentrales Tierlabor, Universitätsklinikum Essen

2.3.2 Knockout ^(-/-) Mäuse

GzmB^{-/-}	eigene Zucht, Zentrales Tierlabor; Universitätsklinikum Essen (88)
IFNAR^{-/-}	Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf (145)
JH^{-/-}	Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf (33)
MDA5^{-/-}	Universitätsklinikum Bonn (69)
TLR2^{-/-}TLR3^{-/-}	Universitätsklinikum Essen (90, 198)

Alle Knockout-Mäuse hatten den C57BL/6-Hintergrund.

Alle Tiere waren zum Versuchsbeginn mindestens acht Wochen alt. Alle Mäuse stammen aus einer speziell pathogenfreien (SPF) Tierzuchtanlage. Die Tiere wurden für die Dauer der Versuche unter SPF Bedingungen gehalten und hatten freien Zugang zu Trinkwasser und Standardfutter. Tierexperimente wurden gemäß den Richtlinien der „*Federation of European Laboratory Animal Science Association*“ durchgeführt. Die Mäuse am Universitätsklinikum Essen wurden unter tierärztlicher Kontrolle gezüchtet.

2.4 Chemikalien und Medien

Wenn nicht anders vermerkt, wurden alle Chemikalien und Medien von den Firmen Applichem (Darmstadt), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma (München) bezogen.

3-Amino 4-Ethylencarbazol (AEC), autoMACS Lauf- und Waschpuffer (Miltenyi Biotec), β -Mercaptoethanol, BSA (Rinderserumalbumin), Chloroform, DMEM-

Medium, Dextrose, Dimethylsulfoxid (DMSO), Dinatriumhydrogenphosphat, EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure), Essigsäure, Ethanol, FACS Clean (BD), FACS Flow (BD), FACS Rinse (BD), FCS (Fötales Kälberserum (Biochrom KG)), Formalin (40%), Glucose, Glycerin, Hefeextrakt, Hepes, Hexadimethrin-Bromid (Polybren A), Isopropanol, Kaliumchlorid, Kaliumdihydrogenphosphat, Kalziumchlorid, LB-Medium (Luria/Miller), L-Glutamin, Magnesiumchlorid, Magnesiumsulfat, Natriumacetat, Natriumazid, Natriumchlorid, Natriumhydrogencarbonat, Natriumpyruvat, Natronlauge, N-N-Dimethylformamid, o-Phenolrot, o-Phenylendiamin (OPD), Pikrinsäure, Polyethylenglycol, RPMI-Medium, Salzsäure, Schwefelsäure, TRIZOL[®], Trypanblau, Trypsin, Tween 20, Wasserstoffperoxid, Zitronensäure

2.5 Zytokine und TLR-Liganden

IFN α 2 (rekombinant)	eBioscience
IFN α 11 (rekombinant)	PBL Biomedical Laboratories
Poly I:C (<i>high molecular weight</i>)	Invivogen

2.6 Antibiotika

Kanamycinsulfat	Roth, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Puromycin	Invivogen, Toulouse, Frankreich

2.7 Häufig verwendete Puffer und Medien

Alle Lösungen und Puffer wurden, wenn nicht anders vermerkt, mit zweifach destilliertem H₂O angesetzt.

Tabelle 2.3 Puffer und Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung
AEC-Gebrauchslösung	AEC-Stock-Lösung wurde 1:20 in 0,05 M Natriumacetat angesetzt und die Reaktion durch Zugabe von 0,5 μ l 30% H ₂ O ₂ /ml Lösung gestartet

AEC-Stocklösung (4 mg/ml)	20 AEC-Tabletten in 100 ml N-N-Dimethylformamid gelöst
Bouin's Lösung	75ml gesättigte Pikrinsäure 25 ml 40% neutrales Formalin 5 ml Essigsäure
Beschichtungspuffer (<i>coating buffer</i>) für intrazelluläre Zytokinfärbungen	0,05 M Natriumcarbonat pH 9,6
Einfriermedium	20 ml FCS 10 ml Dimethylsulfoxid 20 ml RPMI 1640
FACS-Puffer	PBS 0,1% BSA 0,02% Natriumazid
HBS (2x)	12 mM Dextrose-H ₂ O 1,5 mM Dinatriumhydrogenphosphat 50 mM Hepes, pH 7,05 10 mM Kalziumchlorid 280 mM Natriumchlorid Σ 500 ml H ₂ O _{dest.} , pH 7,05
MACS-Puffer (entgast)	0,5% BSA 2 mM EDTA Σ 1l PBS
Medium für 293mlFNalpha11	DMEM 10% FCS 1% Penicillin/Streptomycin 2,5 µg/ml Puromycin

Medium für 293T-Zellen	DMEM 10% FCS 1% Penicillin/Streptomycin
Medium für <i>Mus dunni</i> Zellen	RPMI 1640 10% FCS 0,5% Penicillin/Streptomycin
Medium für Mx/Rage Zellen	DMEM 10% FCS 1% Penicillin/Streptomycin 1 mM Natriumpyruvat 50 µM β-Mercaptoethanol
MuLV-ELISA-Beschichtungspuffer	0,2 M Natriumcarbonat, pH 9,6
MuLV-ELISA-Substratpuffer	66 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O, pH 5, 235 mM Zitronensäure
PBBS	1 l PBS 1 g Glukose

2.8 Antikörper

Die Antikörper (AK) wurden, wenn nicht anders aufgeführt, von *Becton, Dickinson and Company* oder *eBioscience* bezogen.

Tabelle 2.4 Verwendete Antikörper

Antikörper	Klon
AK 34; monoklonaler Maus anti-MuLV p15 (Isotyp IgG _{2b})	
AK 720; monoklonaler Maus anti-MuLV env (Isotyp IgG _{2b})	
CD107a-FITC; monoklonaler Ratte anti Maus AK	1D4B
CD19-APC; monoklonaler Ratte anti Maus AK	1D3
CD25-APC; monoklonaler Ratte anti Maus AK	PC61
CD43-PerCP monoklonaler Ratte anti Maus AK	1B11
CD4-AF700; monoklonaler Ratte anti Maus AK	RM4-5

CD62L-PeCy7; monoklonaler Ratte anti Maus AK	MEL-14
CD69-PE; monoklonaler Hamster anti Maus AK [Invitrogen]	H1.2F3
CD8a-eF450; monoklonaler Ratte anti Maus AK	53-6.7
GzmB-APC; monoklonaler Maus anti Human [Invitrogen]	GB12
IgG _{2b} -PE; monoklonaler Ziege anti Maus AK [Invitrogen]	
IFN γ -FITC; monoklonaler Ratte anti Maus AK	XMG1.2
IL-2-PE; monoklonaler Ratte anti Maus AK	JES6-5H4
Meerrettichperoxidase gekoppelter Ziege anti Maus Ig [Dako]	
Monoklonaler CD16/CD32 (Fc γ III/II) Ratte anti Maus AK	24G2
NK1.1 PerCP-Cy5.5; monoklonaler Ratte anti Maus AK	PK136
Ter119-PE; monoklonaler Ratte anti Maus AK	Ter-119
TNF α -PeCy7; monoklonaler Ratte anti Maus AK	MP6-XT22

Tabelle 2.5 Charakterisierung der Fluorochrome

Bezeichnung	Abkürzung	Absorption (nm)	Emission (nm)
Fluoresceinisothiocyanat	FITC	488	525
R-Phycoerythrin	PE	488	575
Propidiumjodid	PI	488	615
Peridinin-Chlorophyll-Protein Komplex	PerCP	488	670
Phycoerythrin-Cy7	PE Cy7	488	785
Allophycocyanin	APC	633	660
Alexa Fluor 700	AF 700	635	723
eFluor 450	eF450	405	455
7-Aminoactinomycin D	7AAD	488	647

2.9 Tetramere und F-MuLV spezifische Peptide

PE markierte MHC Klasse I H2-Db Tetramere spezifisch für FV GagL Peptid (Db-GagL tetramere) siehe auch (7). APC markierte MHC-Klasse II I-Ab Tetramere spezifisch für F-MuLV Env fn20 Peptid (176). Die MHC-Klasse I Tetramere (FV gag CD8⁺ Epitop gPr80gag85-93 (34) wurden von K. Schepers und T. N. M. Schuhmacher (184) und die MHC-Klasse II Tetramere (F-MuLV env CD4⁺ Epitop

env122-141) von *NIH Tetramer Facility* (Emory University, Atlanta) zur Verfügung gestellt. Das verwendete F-MuLV spezifische CD8 T-Zell-Peptid wurde von der Firma PAN Tecs (Tübingen) synthetisiert. Das Peptid wurde in 100% sterilem DMSO gelöst.

Peptidname: FMR-H-2D_b GagL CD8 Epitop

Sequenz: AbuAbuLAbuLTVFL (170)

2.10 Kommerzielle Standardtests

Tabelle 2.6 Verwendete Standardtests

Standardtests	Bezugsquelle
<i>Cytofix/Cytoperm Intracellular staining kit</i>	BD Pharmingen, Heidelberg
<i>FlowCytomix™ Kits</i> (IFN γ , TNF α , IL-10, IL-12, IL-6, IP-10, MCP-1, MCP-3, MIP-1 α , MIP-1 β und GM-CSF)	eBioscience, San Diego, USA
<i>Mouse Interferon Alpha ELISA</i>	PBL Biomedical Laboratories, Piscataway, USA
<i>Nucleo Spin RNA II</i>	Macherey-Nagel, Düren
<i>NucleoBond® Plasmid Purification</i>	Macherey-Nagel, Düren
<i>QuantiTect RT-PCR Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit</i>	Qiagen, Hilden

2.11 Viren und Zelllinien

Friend Virus Komplex (FV): (49)

Der verwendete FV Stock wurde aus infizierten Mäusen gewonnen (siehe 3.3.). Es wurden zwei verschiedene FV-Stocks verwendet: ein Stock, welcher zusätzlich noch LDV (*Lactat dehydrogenase-elevating virus*) enthielt (FV + LDV) und einer nur mit FV (FV – LDV). Wenn nicht anders im Text erwähnt, wurde immer der FV-Stock ohne LDV für die Infektion injiziert.

Friend Murines Leukämievirus (Helfer-Virus): (49)

Der verwendete Helfer-Virus Stock wurde von *Mus dunni* Zellen produziert. (siehe 3.4)

Tabelle 2.7 Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Bezugsquelle
<i>Mus dunni</i>	Murine Fibroblasten Zelllinie (117)
293T	Menschliche embryonale Nierenepithelzelllinie (<i>Human Embryonic Kidney Cells</i>), beinhaltet DNA-Teile des menschlichen Adenovirus 5 und exprimiert das <i>SV40 large T-Antigen</i> , welches die DNA-Replikation von episomalen Plasmiden mit dem <i>SV40 origin of replication</i> ermöglicht. (175)
Mx/Rage	Virus-transformierte Zelllinie, mit einem temperatur-induzierbarem Promotor vom Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig (23)
293mIFNalpha11	HEK-293E Zellen mit pCEP-PU-IFN episomalem Vektor vom HZI Braunschweig
PK136	Die Hybridomazelllinie PK 136 produziert den monoklonalen Maus IgG _{2a} , einen anti Maus NK1.1 Klon (109).
169.4	Die Hybridomazelllinie 169.4 produziert den monoklonalen Ratten IgG _{2b} anti Maus anti-CD8 Antikörper (36).
YTS191.1	Die Hybridomazelllinie YTS191.1 produziert den monoklonalen IgG _{2b} anti Maus anti-CD4 Antikörper. Die Zelllinie wurde uns bereitgestellt von Dr. Kim Hasenkrug (<i>Laboratory of Persistent Viral Diseases, Rocky Mountain laboratories, NIAID, Montana, USA</i>).

2.12 Oligonukleotide und Sonden

Sämtliche unmodifizierten Oligonukleotide und die Sonde wurden bei Biomers synthetisiert.

Alle verwendeten Primer bzw. Sonde und deren Sequenz sind angegeben.

Tabelle 2.8 Verwendete Oligonukleotide und Sonden

Oligonukleotid bzw. Sonde	Sequenz	Referenz
β-Actin sense	aaatcgtgcgtgacatcaaa	(135)
β-Actin antisense	caagaaggaaggctggaaaa	(135)
F-MuLV env sense	aagtctccccccgcctcta	(184)
F-MuLV env antisense	agtcctggtaagctccctgt	(184)
F-MuLV env-spezifische Oligonukleotid-Sonde	(6FAM) actcccacatgattccccgtcc (TAMRA)	(184)

Tabelle 2.9 Verwendete Primer von Qiagen

Primer-Paar (*Quanti-Tect Primer Assay*)

Mm_Ifna1
Mm_Ifna2
Mm_Ifna4
Mm_Ifna5
Mm_Ifna6
Mm_Ifna7
Mm_Ifna9
Mm_Ifna11
Mm_Ifna12
Mm_Ifna13
Mm_Ifna14
Mm_IfnaAB
Mm_Ifnb
Mm_Ifng
Mm_Mda5
Mm_OAS1a
Mm_Prkrir
Mm_Tlr3

Die Sequenzen der kommerziell erhältlichen Primer von Qiagen wurden vom Hersteller nicht angegeben.

2.13 Plasmide

In dieser Arbeit wurden folgende Plasmide verwendet:

Tabelle 2.10 Eigenschaften der verwendeten Plasmide

Plasmid	Charakteristikum	Bezugsquelle
pkCMVint.	Expressionsvektor mit SV40 ori, HCMV IE1 Enhancer/Promotor, SV40 int polyA Signal, HCMV intron, MHC, Kan ^r	Vical Inc., USA
pkCMVint.IFN α 2	basierend auf pkCMVint., enthält IFN α 2 Fragment -21 - +596 bp	(39)
pkCMVint.IFN α 5	basierend auf pkCMVint., enthält IFN α 5 Fragment -18 - +593 bp	(39)

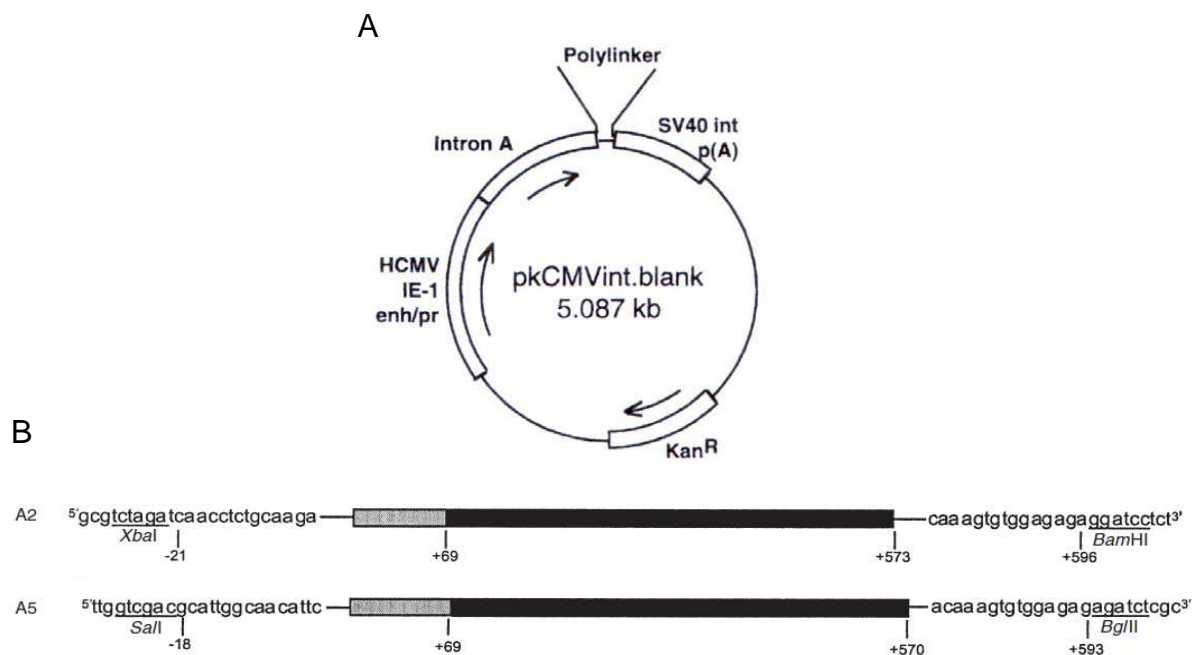


Abbildung 2.1 Schematische Darstellung des verwendeten Plasmids und der enthaltenen Sequenzen der IFN α -Subtypen-Gen.

Der Säugetier-Expressionsvektor pkCMV (Vical) (A) enthält die volle Länge der murinen IFN-Gene der Subtypen IFN α 2, und A5, eingeschlossen der Signalsequenz (grau unterlegt) des reifen Proteins (B).

Der Expressionsvektor pkCMV wurde für die Transfektion der 293T-Zellen verwendet. Das im Überstand enthaltene Interferon wurde für den IFN Inhibitions-Assay und für Therapieversuche in Mäusen verwendet.

3 Methoden

3.1 Versuchstiere

Alle Tierexperimente wurden gemäß den Richtlinien der „*Federation of European Laboratory Animal Science Association*“ durchgeführt.

3.1.1 Infektion

Die Infektion der Mäuse mit dem Friend Virus wurde mit einer G25-Kanüle intravenös (i.v.) in die laterale Schwanzvene durchgeführt. Dazu wurde der Virusstock mit sterilem PBS verdünnt. Für chronische FV-Infektionen wurden 15.000 SFFU (*Spleen Focus Forming Units*) FV (+ LDV) pro C57BL/6-Maus injiziert. Für die Untersuchung der akuten FV-Infektion wurden für Versuche mit Y10A-Mäusen 5000 SFFU FV und für Versuche mit C57BL/6-Mäusen 20.000 SFFU pro Tier injiziert.

3.1.2 Intraperitoneale Injektion

Poly I:C und IFN α -Subtypen wurden jeweils in die Bauchhöhle (intraperitoneal, i.p.) der Maus injiziert. Bei der Injektion befand sich die Maus überspannt in Rückenlage. Das Bauchfell war dabei gespannt, wodurch bei der Injektion keine inneren Organe verletzt werden konnten.

3.1.3 Injektion von Poly I:C

Für die i.p. Injektion von Poly I:C wurden 125 μ g Poly I:C gelöst in 500 μ l sterilem H₂O pro Maus mittels einer G25-Kanüle injiziert. Als Kontrolle wurde 500 μ l steriles H₂O injiziert.

3.1.4 Injektion von IFN α

Für die i.p. Injektion von IFN α -Subtypen bzw. der Kontrolle (leerer Vektor) wurden Zellkulturüberstände von transfizierten 293T-Zellen verwendet. Pro IFN-Injektion wurden 500 μ l 1×10^5 pg/ml verwendet. Die Injektion wurde mit einer G25-Kanüle durchgeführt.

3.1.5 Betäubung der Mäuse mit Isofluran®

Für die retroorbitale Blutentnahme wurden die Mäuse mit Isofluran® betäubt. Dazu wurden die Tiere in einen Glasbehälter gesetzt, in dem sich ein mit Isofluran® getränktes Tuch befand. Sobald die Tiere eine flache Atmung aufwiesen, wurden die Tiere aus dem Glasgefäß genommen.

3.1.6 Palpieren von Milzgrößen

Mit Hilfe der Palpation der Milz wurde der FV-induzierte Krankheitsverlauf verfolgt. Für die Palpation wurde die Maus betäubt und den Milzgrößen ein Wert von 1-4 zugeteilt (siehe Abbildung 1.8).

3.1.7 Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte retroorbital mit einer 3 mm Glaskapillare. Zur Plasmagewinnung wurde eine mit Heparin beschichtete Glaskapillare verwendet und das Blut in einem 1,3 ml Probengefäß mit 1,6 mg EDTA aufgefangen und auf Eis gestellt. Danach wurde das gewonnene Blut für 10 min bei 6000 x g zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Plasma wurde bei -80°C gelagert.

3.1.8 Organentnahme

Zur Organentnahme wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet. Bei den in Rückenlage an den Extremitäten aufgespannten Tieren wurden die zervikalen, axillären und inguinalen Lymphknoten entnommen und bis zur weiteren Verwendung in einer 6-well Platte mit 5 ml PBBS auf Eis gelagert. Zur Entnahme der Milz wurde die Peritonealhaut angehoben und eine kleine Öffnung hinein geschnitten. Durch diese Öffnung wurde die Milz mit einer stumpfen Pinzette herausgehoben und die beiden Blutgefäße durchtrennt. Anschließend wurde die Milz bis zur weiteren Verwendung in einer 6-well Platte mit 10 ml PBBS auf Eis gelagert.

3.2 *In vivo* CTL Assay

Der *in vivo* CTL Assay ermöglicht eine Untersuchung der spezifischen Zytotoxizität von CD8⁺ T-Zellen in der Maus, wobei die Eliminierung von Zielzellen, welche mit

einem Virusepitop beladen sind, analysiert wird. Dazu wurden von naiven C57BL/6 Mäusen Lymphozyten aus Milz und Lymphknoten isoliert. Die Milzzellsuspension wurde zusätzlich über einen Dichtegradienten aufgetrennt, um die Lymphozyten von Erythrozyten und Granulozyten zu isolieren. Dazu wurde die Milzzellsuspension vorsichtig auf Percoll-Trennmedium pipettiert. Es erfolgte eine Zentrifugation (300 x g, 10 min) ohne Bremse, so dass sich die verschiedenen Milzzellen anhand ihrer Dichte auftrennten. Die Lymphozyten befinden sich nach der Zentrifugation in der mittleren Schicht. Diese wurden mit einer Pipette entnommen und mit PBS gewaschen. Nach dem Waschschrift wurden die Lymphozyten aus Milz und Lymphknoten vereinigt und auf zwei 50 ml Röhrchen aufgeteilt. Die Zellsuspension im ersten Röhrchen wurde mit 1 μ M F-MuLV-spezifischem CTL-Epitop (AbuAbuLAbuLTVFL) für 2 h bei 37°C im Brutschrank beladen und anschließend mit 200 nM CFSE (*Carboxyfluorescein succinimidyl ester*) für 10 min bei 37°C gefärbt. Als Kontrolle wurde die unbeladene Zellsuspension im zweiten Röhrchen mit 2 nM CFSE gefärbt. Durch die unterschiedlichen Konzentrationen an CFSE können beide Zellpopulationen später am Durchflusszytometer unterschieden werden. Als nächstes wurden die Zellen gezählt und im Verhältnis 1:1 zusammengeführt. 4×10^7 Zellen wurden in unbehandelte, FV-infizierte und Poly I:C-behandelte, FV-infizierte Mäuse i.v. injiziert (dies entspricht 2×10^7 Zellen jeder Population). Als Kontrollen wurden zusätzlich naive Akzeptormäuse mitgeführt. Nach 2 h wurden den Empfängertieren Blut und Milz entnommen und diese auf die injizierten Zellpopulationen hin untersucht. Im Durchflusszytometer wurde die Zellzahl beider Populationen gemessen und das spezifische Töten von Zielzellen durch CD8⁺ T-Zellen wie folgt bestimmt:

$$\% \text{ Eliminierung} = 100 - \frac{\frac{\% \text{ peptidbeladene Lymphozyten in infizierten Mäusen}}{\% \text{ unbeladene Lymphozyten in infizierten Mäusen}}}{\frac{\% \text{ peptidbeladene Lymphozyten in naiven Mäusen}}{\% \text{ unbeladene Lymphozyten in naiven Mäusen}}} \times 100$$

3.3 *In vivo* Herstellung eines Friend Virus Stocks

Der FV-Komplex besteht aus zwei Viren, dem Spleen Focus Forming Virus (SFFV) und dem Friend Murinen Leukämievirus (F-MuLV). Der FV-Stock wurde aus infizierten Mäusen gewonnen. Dazu wurden Balb/c-Mäuse mit 3000 SFFU infiziert, nach neun Tagen getötet, die Milzen entnommen und ein Milzzellhomogenat (15%) in PBBS mit 2 mM EDTA hergestellt. Der Virusstock wurde bei -80°C gelagert. Zur

Titration dieses Stocks wurden Y10A Mäuse infiziert und den Tieren nach 14 Tagen die Milzen entnommen. Mit Hilfe der sogenannten Bouin's Lösung lassen sich maligne Zellhaufen, die durch die FV-Infektion entstehen, auf der Milz anfärben. Die Anzahl dieser ausgezählten Foci ergibt die Viruskonzentration.

3.4 Herstellung eines F-MuLV-Stocks *in vitro*

Mus dunni Zellen wurden in 25 cm² Zellkulturflaschen in 10 ml RPMI-Vollmedium ausgesät und anschließend wurden 50 µl Polybrene (0,8 µg/ml) zugegeben. Danach wurden die Zellen mit F-MuLV (MOI=1) infiziert. Die Zellen wurden anschließend bei 37°C im Brutschrank inkubiert, nach drei Tagen mit Trypsin abgelöst und in RPMI Medium aufgenommen. Zur Überprüfung des Anteils an infizierten *Mus dunni* Zellen wurden diese mit AK720 und PE-gekoppelten Ziege-anti-Maus anti-IgG2b Antikörper für jeweils 30 min inkubiert. Der prozentuale Anteil der infizierten Zellen wurde anschließend im Durchflusszytometer bestimmt. Wenn die Zellen zu 50-100% infiziert waren, wurden diese in 175 cm² Zellkulturflaschen in 50 ml RPMI-Vollmedium ausgesät. Die Zellen wurden im Brutschrank inkubiert, bis diese ca. 50-75% konfluent waren. Dann wurde das Medium gewechselt und die Zellen für 24 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurde der Überstand geerntet, aliquotiert und bei -80°C gelagert. Für die weitere Verwendung wurde die Aktivität des F-MuLV bestimmt. Der Test zur Bestimmung der Aktivität des F-MuLV-Stocks beruht auf dem Prinzip des *Infectious Center Assays* (siehe 3.8).

3.5 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer und gibt zusätzlich Auskunft über den Vitalitätszustand der Zellen. Hierzu wird ein Vitalitätstest durchgeführt, der darauf beruht, dass tote Zellen eine veränderte Membrandurchlässigkeit aufweisen. Farbstoffe, wie z.B. Trypanblau, können die Membran lebender Zellen nicht passieren und gelangen nur in tote Zellen. Beim Auszählen ist darauf zu achten, keine Zellaggregate auszuzählen, da dies die Genauigkeit der Zählung beeinflusst.

In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurde eine geeignete Verdünnung der Zellen (1:10) mit Trypanblau erstellt und mittels einer Neubauer-Zählkammer vier Großquadrate à 16 Kleinquadraten ausgezählt.

Da jedes Quadrat eine Fläche von $0,04 \text{ mm}^2$ besitzt und eine Tiefe von 1 mm aufweist, ergibt sich ein Volumen von $0,004 \text{ }\mu\text{l}$. Die ermittelte Zellzahl konnte wie folgt berechnet werden:

$$C = N \times 10^4$$

C = Zellen pro ml

N = Mittelwert der gezählten Zellen

10^4 = Volumenrechnungsfaktor für 1 mm^3

Die Gesamtzellzahl wurde berechnet, indem die Zellen pro ml mit dem Volumen multipliziert wird.

3.6 Zellkultur

3.6.1 Kultivierung von Zellen

Die Zellkultur erfolgte allgemein in einem Begasungsbrutschrank bei 37°C , 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO_2 /Luft-Gemisch. Die Mx/Rage-Zellen wurden bei einer Temperatur von 32°C kultiviert. Adhärent wachsende Zelllinien wurden in liegenden Kulturflaschen inkubiert. Zum Ernten und Verdünnen dieser Zellen wurde das verbrauchte Medium dekantiert und die Zellen mit PBS für kurze Zeit überschichtet, um das restliche Medium zu entfernen. Nach Entfernen des PBS wurden die Zellen mit 5%Trypsin-EDTA überschichtet und für 5 min im Brutschrank inkubiert bis sich die Zellen vom Boden ablösten. Dieser Prozess wurde anschließend mit 10 ml kaltem Vollmedium gestoppt und die Zellsuspension wurde abzentrifugiert ($300 \times g$; 5 min). Das so gewonnene Zellpellet wurde in Vollmedium gelöst und im Verhältnis 1:5 oder 1:10 in neue Kulturflaschen ausgesät.

3.6.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Einfrieren

Für die Lagerung der Zellen in Stickstoff wurden diese in Medium mit 10% DMSO eingefroren. DMSO diffundiert durch die Zellmembran in die Zelle und ersetzt dort das Wasser. Es erhält somit die Löslichkeit in der Zelle und sorgt dafür, dass beim Einfriervorgang keine Eiskristalle gebildet werden, welche die Zellstruktur zerstören würden.

Um die Zellen einzufrieren wurde das Medium abgenommen und die Zellen in PBS gewaschen. Nach der Zentrifugation wurde das Zellpellet in dem zuvor angesetzten 10%igen DMSO-haltigen Medium resuspendiert und in einem entsprechenden Volumen eingefroren.

Auftauen

Bevor die in Medium mit 10% DMSO eingefrorenen Zellen wieder in Kultur genommen werden können, muss zunächst das DMSO aus dem Medium entfernt werden. Hierfür wurden die Zellen schnell im Wasserbad (37°C) aufgetaut, da das DMSO für die Zellen toxisch ist. Nach dem Auftauen wurden die Zellen in 10 ml Medium aufgenommen und zentrifugiert (300 x g, 5 min). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in frischem Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in eine Zellkulturflasche überführt und diese auf das entsprechende Volumen mit Medium aufgefüllt. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37°C.

3.6.3 Stimulation von Zellen mit Poly I:C

Zur Stimulation von Zellen *in vitro* wurden diese mit 50 µg/ml Poly I:C in RPMI-Medium für 24 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

3.7 Herstellung einer Milzsuspension

Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension wurden die entnommenen Milzen durch ein Zellsieb (70 µm) gerieben; die groben Bestandteile wurden entfernt, und die Einzelzellsuspension wurde in ein 50 ml Röhrchen überführt. Die Milzzellsuspension wurde wegen der hohen Zellzahl mit PBBS auf 10 ml aufgefüllt. Von dieser Suspension wurde ein Aliquot zur Zellzahlbestimmung entnommen und die Suspension dann mit 300 x g bei 10°C für 8 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit RPMI-Medium auf die jeweilige gewünschte Zellzahl eingestellt.

3.8 Nachweis von infektiösen Zellen mit Hilfe des *Infectious Center Assays*

Bei dem *Infectious Center Assay* (IC-Assay) wurde zur Bestimmung der Anzahl FV-infektiöser Zellen in der Milz eine Zellsuspension von FV-infizierten Mäusen hergestellt (siehe 3.7). Von der Suspension wurde eine Verdünnungsreihe (10^7 –

10^2) mit *Mus dunni* Zellen als Indikatorzellen koinkubiert. Infektiöse Zellen infizieren durch Zell-Zellkontakt die *Mus dunni* Zellen. Diese teilen sich und geben das Friend Virus an ihre Tochterzellen weiter. Es entsteht ein Virus-Focus. Diese Foci wurden mittels Antikörperreaktion und Substratreaktion angefärbt. Als FV-spezifischer Antikörper wurde AK720 verwendet, welcher an das *env*-Protein von F-MuLV bindet. Der Zweitantikörper, welcher an Meerrettichperoxidase gekoppelt ist (Ziege Anti Maus IgG2b-HRP), bindet kovalent an die Fc-Region des ersten Antikörpers. Das lösliche Substrat AEC wird von der Peroxidase umgesetzt und in ein unlösliches rotes Produkt umgewandelt. Die roten Punkte markieren auf dem Zellrasen die Virus-Foci. Anhand der Verdünnungsreihe und der Gesamtzellzahl kann die Anzahl der infektiösen Zellen in der Milz bestimmt werden.

Zunächst wurden in eine 6-well Gewebekulturplatte pro Vertiefung 2×10^4 *Mus dunni* Zellen in 3 ml Medium ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellsuspensionen der verschiedenen Gewebe auf 1×10^8 Zellen/ml eingestellt. Von einer Verdünnungsreihe wurden jeweils 1×10^7 bis 1×10^2 Zellen auf die *Mus dunni* Zellen gegeben und drei Tage im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle des Tests wurden jeweils 3 Vertiefungen mit F-MuLV und 3 weitere ohne Virus bzw. infektiöse Zellen mitgeführt. Bei der Kontrolle mit freiem Virus musste Polybren A ($8 \mu\text{g/ml}$) hinzugegeben werden, damit das freie Virus besser an die Rezeptoren der Zelloberfläche binden konnte.

Nach einer dreitägigen Inkubation wurde das Medium entfernt. Die Zellen wurden dann 5 min mit 95% Ethanol fixiert und zunächst einmal mit PBS und dann einmal mit PBS komplementiert mit 0,1% BSA gewaschen. Dann wurden pro Vertiefung 700 μl Hybridomaüberstand des ersten Antikörpers (AK720) zugegeben und 120 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Hybridomaüberstand wurde nach Ablauf der Inkubationszeit verworfen und die Platten wurden zweimal mit PBS (+ 0,1% BSA) gewaschen. Der zweite Antikörper (Ziege anti Maus IgG2b-HRP; 0,05 mol/l) wurde 1:500 in PBS (+ 0,1% BSA) verdünnt, und davon wurden jeweils 700 μl pro Vertiefung auf die Zellen gegeben und 90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Dekantieren und zweimaligem Waschen mit PBS wurden jeweils 2 ml frisch angesetzte Substratlösung AEC zugegeben und 20 min im Dunkeln inkubiert. Nach dem Abschütten, Waschen mit H_2O und Trocknen der Platten über Nacht wurden die Foci gezählt. Aus dem Mittelwert der Anzahl an Foci pro Verdünnung und der Gesamtanzahl der Milzzellen pro Maus wurde die Anzahl infektiöser Milzzellen pro Maus berechnet.

3.9 Interferon Inhibitionsassay

Mus dunni Zellen wurden 24 h mit IFN α -Subtypen in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium gewechselt und Polybren A (8 μ g/ml) zu den Zellen gegeben, damit das freie Virus besser an die Rezeptoren der Zelloberfläche binden kann. Weiterhin wurden die Zellen mit 25 FFU F-MuLV infiziert und für 3 Tage bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit 95% Ethanol fixiert und mit dem F-MuLV-*env* spezifischen Antikörper AK720 gefärbt (siehe 3.8). Durch Zählen der Foci kann ermittelt werden, ob die jeweiligen IFN α -Subtypen die FV-Replikation inhibieren. Dazu wurde eine Kontrolle ohne IFN α mitgeführt.

3.10 Bestimmung der Typ I Interferon-Konzentration mit Hilfe eines Mx/Rage-Bioassays

Um die Konzentration der hergestellten IFN α -Subtypen (vergleiche 3.19) zu bestimmen, wurde ein Mx/Rage-Bioassay durchgeführt. Diese Fibroblastenzelllinie exprimiert den IFN α -Rezeptor. Nach Bindung von murinem IFN α kommt es zur Expression einer Cre-Rekombinase, welche dann eine loxP-flankierte Resistenzgen-Kassette genaufwärts von eGFP (*enhanced green fluorescent protein*) deletiert. Dadurch kommt es zur Expression von eGFP, welches durchflusszytometrisch gemessen werden kann.

Es wurden 2×10^4 Mx/Rage-Zellen pro Vertiefung einer 96-well-Platte ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit verschiedenen Verdünnungen der selbst hergestellten IFN α -Subtypen inkubiert. Zusätzlich wurden Standardreihen mit rekombinanten IFN α -Subtypen und Negativkontrollen ohne IFN α mitgeführt. Die Zellen wurden 24 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Medium gewechselt und die Zellen wurden für weitere 48 h im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf dieser Inkubationsphase wurde das Medium dekantiert und die Zellen mit PBS gewaschen, um weitere Mediumreste zu entfernen. Die Zellen wurden mit Trypsin abgelöst und erneut mit PBS gewaschen (300 x g; 5min). Diese wurden dann in FACS-Puffer resuspendiert und mit Hilfe des LSR II Durchflusszytometers analysiert. Zur Ausgrenzung toter Zellen wurde kurz vor der Messung 7AAD zu den Zellen hinzugegeben. Durch den Einsatz von Standardreihen rekombinanter IFN α -Subtypen kann die genaue Konzentration an biologisch aktivem Protein in unbekannten Proben anhand der eGFP-Expression ermittelt werden.

3.11 Sortieren und Isolieren von Lymphozyten aus einem Zellgemisch mittels MACS

Die MACS-Methode (*Magnetic Cell Sorting*) ermöglicht die Auftrennung von Zellpopulationen aus einem Zellgemisch anhand ihrer Oberflächenmarker. Hierfür werden zwei Komponenten benötigt: die MACS *MicroBeads* und eine ferromagnetische Säule. Bei den *Beads* handelt es sich um kleine magnetische Kügelchen, die an monoklonale Antikörper gebunden sind.

Durch Inkubation des Zellgemisches mit den *Beads* binden die Antikörper spezifisch die entsprechenden Oberflächenmoleküle, so dass diejenigen Zellen, welche die Marker auf ihrer Oberfläche aufweisen, indirekt mit den Eisenkügelchen markiert werden. Beim anschließenden Transferieren des Zellgemisches auf die ferromagnetische Säule bleiben die markierten Zellen in der Säule, während die nicht markierten durchlaufen. Die markierten Zellen erhält man, indem man die Säule aus dem magnetischen Feld entfernt und die zurückgehaltenen Zellen mittels MACS-Puffer eluiert. Somit ergeben sich zwei Möglichkeiten der Auftrennung: zum Einen eine Positivselektion, bei der die Population von Interesse mit MACS-*MicroBeads* markiert und von den restlichen Zellpopulationen abgetrennt wird, und zum Anderen die Möglichkeit der Depletion, bei der MACS-*MicroBeads* gekoppelte Zellen in der Säule zurückgehalten werden und sich die aufzureinigende Population im Durchfluss befindet. Die Qualität der Aufreinigung kann anschließend mit einer FACS-Analyse überprüft werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden alle MACS-Selektionen nach Herstellerangaben durchgeführt und mittels autoMACS[®] Pro Separator sortiert. Die eluierten Zellen wurden mit MACS-Puffer gewaschen und anschließend mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

3.12 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie lassen sich einzelne Zellen oder Zellpopulationen aus einer heterogenen Zellpopulation analysieren. Dabei können spezielle Oberflächenproteine und intrazelluläre Proteine der Zellen identifiziert, charakterisiert und quantifiziert werden. Die Zellen der Suspension werden einzeln durch einen Laserstrahl erfasst. Die Ablenkung der Strahlen beim Auftreffen des Laserstrahls auf die Zelle wird in zwei Kategorien aufgeteilt. Das Licht, welches die relative Größe der einzelnen Zellen detektiert, wird Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) genannt,

und das Licht, das von den Zellen um 90° abgelenkt wird und somit Aussagen über die innere Granularität der Zellen erlaubt, wird Seitwärtsstreulicht (*sideward scatter*, SSC) genannt.

Diese Methode ermöglicht unter anderem eine quantitative Bestimmung von Oberflächenmolekülen. Die Grundlage dafür ist eine Antigen-Antikörper-Reaktion, welche mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern durchgeführt wird. Die Zellen binden die monoklonalen Antikörper, die gegen bestimmte Oberflächenmoleküle gerichtet sind. Zur Analyse werden die Zellen in einer Einzelzellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Bei exakter Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie in Form von Photonen auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die emittierte durch einen Photonendetektor registrierte Photonenkonzentration verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern pro Zelle. Die Lichtsignale werden proportional zur Lichtstärke in elektronische Signale umgewandelt (siehe Abbildung 3.1). Die gleichzeitige durchflusszytometrische (*Fluorescence activated cell sorting*, FACS) Messung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ist möglich, da sich die eingesetzten Farbstoffe zwar bei einer gemeinsamen Wellenlänge anregen lassen, aber über unterschiedliche, für den jeweiligen Farbstoff charakteristische Emissionsspektren verfügen.

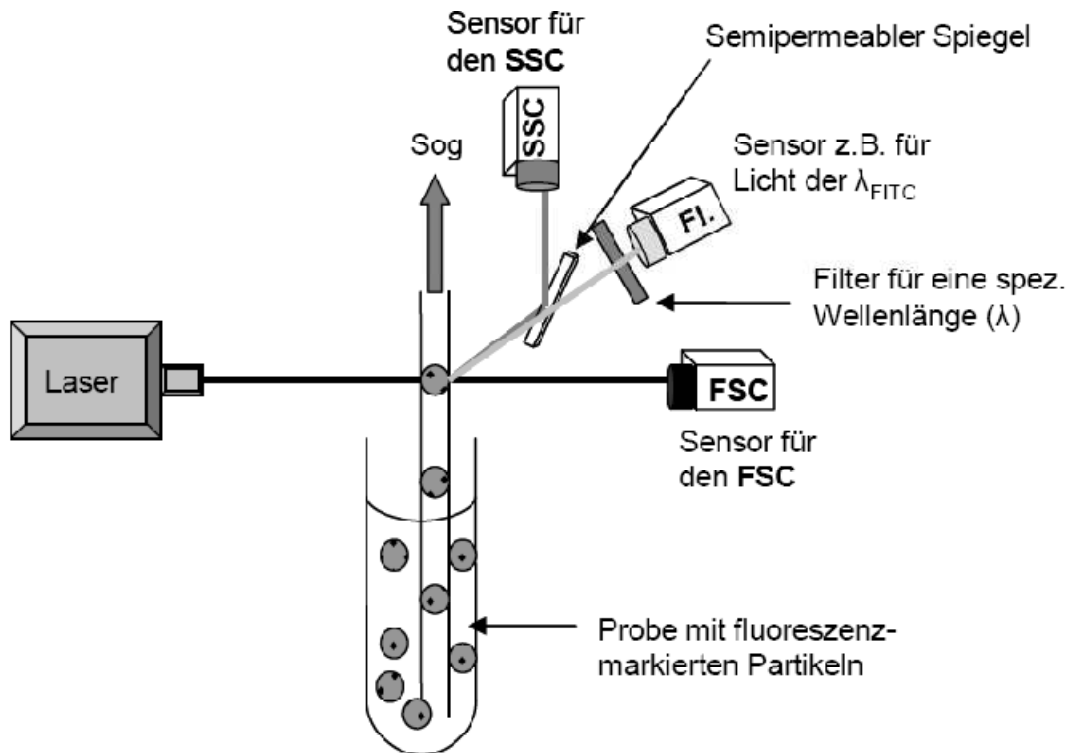


Abbildung 3.1 Funktionsweise eines Durchflusszytometers (verändert nach (164))

Für jede FACS-Färbung werden die Zellen in FACS-Puffer aufgenommen. Das in diesem Puffer enthaltene Natriumazid wirkt antibakteriell. EDTA verringert die Adhäsion der Zellen an die Gefäßwand und BSA das Ausmaß an unspezifischen Antikörperbindungen. Bei der Auswertung, z.B. mit dem FACS Diva Analyse Programm, wird meist ein Punktgraph (*Dot-Plot*) erstellt, in welchem jede Zelle als ein Punkt dargestellt ist. Die Position des Punktes im Graphen lässt Rückschlüsse auf die Zelleigenschaften zu. So können anhand der Größe und Granularität die Zellen im Punktgraphen aufgetrennt und unterschieden werden.

3.12.1 Färbung von Oberflächenproteinen

Es wurden 1×10^6 Zellen in FACS-Puffer aufgenommen, für 5 min mit $300 \times g$ zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 100 µl FACS-Puffer und 0,5 µl konjugiertem Antikörper gegen verschiedene Oberflächenmoleküle z.B. CD8, CD4, NK1.1, CD19 aufgenommen und 20 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Die gefärbten Zellen wurden danach mit 200 µl FACS-Puffer gewaschen ($300 \times g$; 5 min) und anschließend in einem Volumen von 300 µl zur Messung resuspendiert. Um tote Zellen und Zelltrümmer bei der Durchflusszytometrie

auszuschließen, wurde kurz vor der Messung der Farbstoff 7AAD zu den Zellen gegeben. 7AAD ist ein von sich aus fluoreszierender DNA Farbstoff, der selektiv die GC Regionen der DNA bindet und so mit dieser einen Komplex bildet. Bei gesunden Zellen verhindert die intakte Zellmembran die schnelle Diffusion von 7AAD und wodurch es nur sehr langsam in lebende Zellen eindringt. Ist eine Zelle aber apoptotisch oder wird sie während des Messvorgangs geschädigt, so verliert die Zellmembran ihre Funktion als Schutzbarriere und das 7AAD dringt schnell in die Zelle ein. Dort gelangt es schließlich in den Zellkern und an die DNA, in welche es interkaliert. Die Zelle wird somit als „tot“ markiert und kann vom Durchflusszytometer erfasst werden. Zu den gefärbten Zellen wurde 7AAD im Verhältnis 1:250 hinzugegeben und die Probe umgehend mit einem LSRII Durchflusszytometer gemessen.

3.12.2 Intrazelluläre Färbung von Granzym B (GzmB)

Zum Nachweis intrazellulärer Proteine (z.B. GzmB) wurden die Zellen nach der Oberflächenfärbung einmal in FACS-Puffer gewaschen (300 x g; 5 min) und dann nach dem Protokoll des Herstellers des Cytofix/Cytoperm-Kits fixiert und permeabilisiert. Durch die Permeabilisierung können Antikörper, welche gegen intrazelluläre Proteine gerichtet sind, in die Zelle eindringen und diese binden. Nach einmaligem Waschen mit dem entsprechenden PermWash-Puffer wurden die Zellen mit 100 µl PermWash-Puffer mit 0,5 µl GzmB-Antikörper für 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden anschließend einmal mit PermWash-Puffer und einmal mit FACS-Puffer gewaschen (300 x g; 5 min), in einem Volumen von 300 µl FACS-Puffer resuspendiert und umgehend durchflusszytometrisch analysiert.

3.12.3 Intrazelluläre Färbung von IFN γ , TNF α und IL-2

Um die Produktion von Zytokinen wie z.B. IFN γ , TNF α und IL-2 in den Zellen zu untersuchen, müssen diese zunächst zur Zytokinproduktion angeregt und die Sekretion verhindert werden, so dass die Zytokine in der Zelle akkumulieren. Dazu wurden die Zellen für 5 h mit 10 µg/ml immobilisiertem α CD3, 2 µg/ml α CD28 und 2 µg/ml Brefeldin A (BFA) in RPMI-Medium (komplementiert mit 50 µM β -Mercaptoethanol) bei 37°C inkubiert. Durch die Antikörper kommt es zu einer unspezifischen Stimulation des T-Zellrezeptors und der damit verbundenen Zytokinsynthese. BFA blockiert den vesikulären Proteintransport vom rauen

endoplasmatischen Retikulum zum Golgiapparat und führt so zu einer Akkumulation von Zytokinen in der Zelle. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und die Oberflächenmoleküle wurden wie bereits in 3.12.1 beschrieben gefärbt. Danach erfolgte die Fixierung, Permeabilisierung und die Färbung intrazellulärer Proteine wie in Abschnitt 3.12.2 beschrieben. Die Zellen wurden nach der Färbung in einem Volumen von 300 µl mit FACS-Puffer aufgenommen und umgehend mit Hilfe des LSR II Durchflusszytometers analysiert.

3.12.4 Bestimmung der Prozentzahl von FV-infizierten Zellen im Blut

Für die Bestimmung der Anzahl an FV-infizierten Zellen im Blut, wurden 1×10^6 Zellen aus dem Blut mit dem Antikörper 34 (AK34) inkubiert. FV-infizierte Zellen exprimieren an der Oberfläche das glykolysierte FV gag-Protein, an welches der AK34 bindet. Der AK34 ist nicht mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert, so dass für die durchflusszytometrische Analyse ein zweiter Antikörper eingesetzt werden musste. Dieser zweite AK (anti-IgG2b-PE; monoklonaler Ziege-anti-Maus Antikörper) bindet an den Fc-Teil des AK34. Nach 30-minütiger Inkubation der Zellen mit AK34 wurden die Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen (300 x g; 5 min). Es folgte eine Inkubation der Zellen mit anti-IgG2b-PE für 30 min bei 4°C im Dunkeln. Nach erneutem Waschen der Zellen mit FACS-Puffer wurden die Zellen umgehend im Durchflusszytometer analysiert.

3.12.5 Tetramerfärbung

Eine Methode, um Antigen-spezifische T-Zellen in einer T-Zellpopulation zu identifizieren und quantifizieren, ist die Tetramer-Färbung. MHC Klasse I und II-Tetramere bestehen aus vier Peptid-MHC Klasse I bzw. II Komplexen, die über eine Biotin-Streptavidin-Bindung kovalent miteinander verknüpft sind. Der Komplex wird über konjugiertes PE bzw. APC im Durchflusszytometer visualisiert. Diese Methode beruht auf den Wechselwirkungen des Antigen-spezifischen T-Zellrezeptors mit den Peptid-bindenden MHC I bzw. II Komplexen. Der Aufbau eines Tetramers ist in Abbildung 3.2 gezeigt.

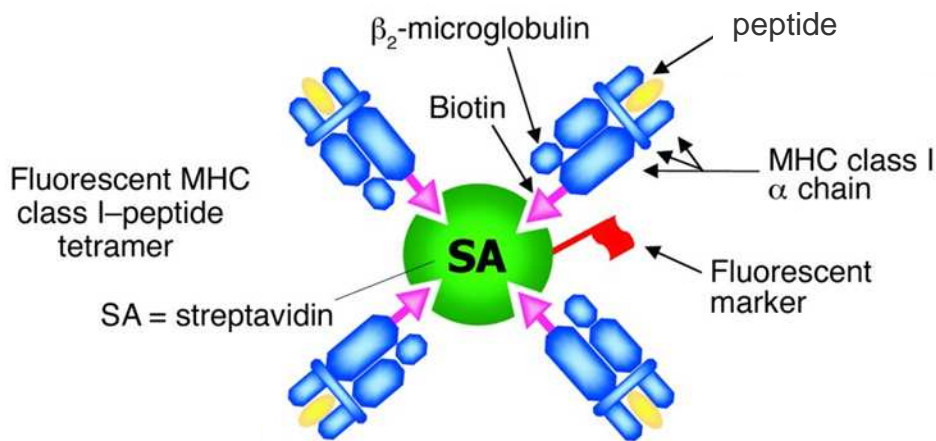


Abbildung 3.2 Aufbau eines MHC Klasse I Tetramers (verändert nach (51))

Für die Tetramerfärbung wurden die Zellen in FACS-Puffer gewaschen (300 x g; 5 min) und 5×10^5 Zellen (MHC-I-Färbung) bzw. 1×10^6 Zellen (MHC-II-Färbung) pro Färbung eingesetzt.

Für die MHC-I-Färbung wurden die Zellen erneut gewaschen und in einem Volumen von 50 µl für 15 min bei Raumtemperatur gefärbt. Für die Dreifach-Färbung wurden 2,5 µl Tetramere mit den Antikörpern αCD8 (0,5 µl) und αCD43 (0,5 µl) eingesetzt. Bei der MHC-Klasse II Färbung wurden die Zellen nach dem Waschen mit 10 µl Fc-Block (1:200 in RPMI-Medium verdünnt) für 5 min inkubiert, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Danach wurden die MHC-II Tetramere (1:100 verdünnt in RPMI-Medium) zu den Zellen hinzugegeben und für 2h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen (300 x g; 5 min) und mit weiteren Antikörpern gegen Oberflächenproteine (z.B. MAC1 (CD11b) und CD4) in RPMI-Medium für weitere 30 min bei 4°C inkubiert. Im Anschluss an beide Tetramer-Färbungen wurden die Zellen zweimal mit FACS Puffer gewaschen, in 300 µl FACS-Puffer mit 7AAD aufgenommen und umgehend im Durchflusszytometer gemessen.

3.13 Proteinnachweis mittels ELISA

Der ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) erlaubt einen qualitativen und quantitativen Nachweis von Proteinen (z.B. Zytokine, Chemokine oder Antikörper) in Zellkulturüberständen und Plasmaproben. Der ELISA bedient sich eines Enzyms als Marker. Die Proteinkonzentration kann somit anhand des Substratumsatzes bestimmt werden. Bei einem *Sandwich*-ELISA, sind die monoklonalen Antikörper

bereits auf der Mikrotiterplatte gebunden. Das in den Zellkulturüberständen vorkommende Protein wird im ersten Schritt über diese Antikörper auf der Platte gebunden. Nachdem über mehrere Waschschriffe ungebundene Proteine entfernt werden, wird ein spezifischer Enzym-gekoppelter polyklonaler Antikörper zugegeben, der wiederum an das gebundene Protein auf der Platte bindet. Das Enzym, welches in diesen Tests verwendet wird, ist eine Meerrettichperoxidase (HRP). Um das ungebundene Protein nun zu entfernen, erfolgen erneute Waschschriffe und anschließend wird eine Substratlösung hinzugegeben. Als Substrat wirkt hier Tetramethylbenzidin, welches durch die Peroxidase zu einem blauen Produkt umgewandelt wird. Nach Zugabe der Stopp-Lösung (Konzentrierte Schwefelsäure) verfärbt sich das Produkt von blau nach gelb. An einem Spektrometer kann anschließend die Absorption der Lösung bestimmt werden. Die Farbkonzentration verhält sich hierbei proportional zur gebundenen Proteinmenge. Über eine Standardkurve, welche in jedem Test mitgeführt wird, lassen sich die genauen Konzentrationswerte der Proteine ermitteln. Die Messung erfolgt mit Hilfe eines *ELISA-Readers*.

3.13.1 IFN α ELISA

Der IFN α -ELISA wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.13.2 *Bead Array* zum Nachweis diverser Zytokine und Chemokine

Der *Bead Array* verläuft nach dem Prinzip eines *Sandwich*-ELISAs, wobei jedoch bei geringem Probenvolumen (25 μ l) bis zu 20 verschiedene Proteine gleichzeitig durchflusszytometrisch analysiert werden können.

Die *Bead Arrays* wurden für folgende Proteine nach Herstellerangaben durchgeführt: IFN γ , TNF α , IL-10, IL-12, IL-6, IP-10, MCP-1, MCP-3, MIP-1 α , MIP-1 β und GM-CSF.

3.13.3 Bestimmung von Friend Virus-bindenden Antikörpern (MuLV-ELISA)

Mit der Bestimmung von F-MuLV bindenden Antikörpern können F-MuLV-spezifische, gebildete Antikörper im Plasma nachgewiesen werden.

An den Boden einer 96-well Rundbodenplatte wurde über Nacht bei 4°C 100 μ l Virusantigen (0,5 μ g) in Beschichtungspuffer gebunden. Die Platten wurden 5x mit PBS + 0,5% Tween 20 gewaschen und die unspezifischen Bindungsstellen 30 min

bei Raumtemperatur mit 100 µl pro Vertiefung PBS + 10% FCS abgesättigt. Danach wurde die Platte ausgeklopft, 100 µl der hergestellten Plasmaverdünnungen (1:10 und 1:100) in die jeweilige Vertiefungen gegeben und bei 4°C 1 h inkubiert. Es folgte erneutes Waschen (5x) der Platte mit PBS + 0,5% Tween 20. Dann wurden je 100 µl des HRP-gekoppelten Esel-anti-Maus IgG Zweitantikörpers in jede Vertiefung gegeben und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 5x Waschen mit PBS + 0,5% Tween 20 wurde die Substratreaktion mit o-Phenylendiamin (oPD) durchgeführt. Dafür wurde eine oPD-Tablette in 10 ml Substratpuffer gelöst und die Reaktion mit 10 µl 10% H₂O₂ gestartet. Von der mit H₂O₂ versetzten Substratlösung wurden 100 µl pro Vertiefung gegeben und die Platte 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde mit 50 µl konzentrierter Schwefelsäure abgestoppt und bei einer Extinktion von 490 nm gemessen.

Für die Bestimmung des FV-spezifischen Antikörpertiters wurde der dreifache Extinktionswert des Plasmas einer naiven Maus als Grenze für eine positive Reaktion festgesetzt.

3.14 Depletion von Lymphozyten mit Hilfe zellspezifischer Antikörper

Zur Depletion von Lymphozyten in Mäusen wurden zellspezifische monoklonale Antikörper mittels Hybridomazelllinien hergestellt. Diese wurden bei der Kultivierung in den Überstand abgegeben. Zur Depletion von NK-Zellen wurde der Überstand der Hybridomazelllinie PK 136 verwendet, für die Depletion von CD8⁺ T-Zellen der Überstand der Hybridomazelllinie 169.4. und für die Depletion von CD4⁺ T-Zellen der Überstand der Hybridomazelllinie YTS191.1. Die erste Injektion wurde am Tag der Infektion mit dem Friend Virus durchgeführt. Für die Depletion wurden pro Injektion 500 µl Zellkulturüberstand i.p. mit einer G25-Kanüle inokuliert. Weitere Injektionen erfolgten im Abstand von 2 Tagen bis zur Organentnahme.

Die Depletion der Lymphozyten wurde im Durchflusszytometer mit zellspezifischen Markern überprüft.

3.15 Bestimmung von Friend Virus-neutralisierenden Antikörpern

Mus dunni Zellen wurden in 24-well Platten ausgesät (7,5 x 10³ Zellen pro Vertiefung in 2 ml Vollmedium) und für 24 h im Brutschrank bei 37°C verwahrt. Am nächsten Tag wurden 10 µl Polybren (8 µg/ml) zu den Vertiefungen hinzugefügt. Gleichzeitig

wurden die Plasmaproben der Mäuse bei 56°C für 30 min hitzeinaktiviert, um das vorhandene Virus zu deaktivieren. In einer 96-well Platte wurden 15 µl F-MuLV bekannter Konzentration und 10 µl Meerschweinchenkomplement zu fortlaufenden Plasmaverdünnungen hinzugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Zusätzlich wurden Negativkontrollen (PBS) und Positivkontrollen (monoklonaler AK48, dessen neutralisierende Wirkung bekannt ist) mitgeführt. Anschließend wurden zu jeder Vertiefung 120 µl kaltes PBS hinzugefügt und von jeder Vertiefung wurden dann 50 µl zu den *Mus dunni* Zellen gegeben und für 3 Tage bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden nach dieser Zeit fixiert und wie bereits bei 3.8 beschrieben mit AK720 angefärbt und die Foci ausgezählt. Ab einer Reduktion der Anzahl der Foci um 25% findet eine Neutralisierung des Virus durch Antikörper statt.

3.16 Bakterienhaltung

Für Flüssigkulturen wurde LB-Medium (25 g/l) nach dem Autoklavieren mit Kanamycin (50 mg/l) versetzt und bei 37°C und ca. 125 U/min für 12-18h bebrütet. Zur dauerhaften Lagerung wurden 0,8 ml Bakterienkultur mit 0,2 ml Glycerol bei -80°C eingefroren.

3.17 Säulenaufreinigung von Plasmid-DNA (Megapräparation)

Zur Isolation größerer Mengen Plasmid-DNA wurden 30 µl Flüssigkultur in 1500 ml LB-Medium komplementiert mit Kanamycin gegeben und in einem 2000 ml Erlenmeyerkolben über Nacht in einem Schüttelinkubator bei 37°C angezüchtet. Die Plasmidisolierung erfolgte mit dem Macherey-Nagel NucleoBond® Plasmid Purification Mega Kit nach Angaben des Herstellers.

3.18 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Messung der Plasmid-DNA-Konzentration erfolgte mit dem Spektrophotometer Nano-Drop ND 2000 der Firma Peqlab.

3.19 Kalziumphosphat-Transfektion von 293T-Zellen

293T-Zellen lassen sich besonders einfach mit Kalziumphosphat-Präzipitaten transfizieren (modifiziert nach (156)). Bei der Pufferherstellung ist die pH-Einstellung

besonders wichtig, deshalb wurden zuvor die pH-Werte 7.0, 7.05 und 7.10 auf die Transfektionseffizienz hin überprüft.

Am Tag vor der Transfektion wurden in 6-well Platten 2×10^6 Zellen in 5 ml DMEM + 10% FCS ausgesät. Am Morgen der Transfektion wurde das Medium entfernt und gegen 4 ml frisches DMEM + 10% FCS ausgewechselt. Für jeden Ansatz wurden 62 μ l 2 M CaCl_2 mit 15 μ g Plasmid-DNA mit H_2O auf 500 μ l eingestellt. Dieser Ansatz wurde anschließend in 500 μ l 2xHBS unter starkem Mixen mit Blasenbildung aufgenommen und sofort tropfenweise über die Vertiefung gegeben. 7-10 h nach der Transfektion wurde das Medium vorsichtig entfernt und 2 ml DMEM + 2% FCS zu den Zellen gegeben. 48 h nach der Transfektion wurde der Überstand auf IFN α -Subtypen-Konzentration mit Hilfe eines Mx/Rage-Bioassays (siehe 3.10) getestet.

3.20 Arbeiten mit RNA

3.20.1 Isolierung von Gesamt-RNA mittels TRIZOL[®]

1×10^6 Zellen wurden direkt nach der Isolation in 1 ml TRIZOL[®] aufgenommen und bei -80°C verwahrt. Zur RNA-Isolierung wurden 200 μ l Chloroform zu der aufgetauten Probe gegeben und diese kräftig geschüttelt. Danach erfolgte eine Inkubation von 3 min bei Raumtemperatur und eine anschließende Zentrifugation bei 12.000 x g für 15 min bei 2-8°C.

Von den zwei Phasen wurde die obere klare wässrige Phase in ein frisches Tube überführt und die untere rote organische Phase verworfen. Zu der wässrigen Phase wurden 500 μ l Isopropanol hinzugeben. Nach dem Schütteln der Probe erfolgte eine 10 minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Probe für 10 min bei 12.000 x g und 2-8°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet wurde mit 1 ml 75% EtOH gewaschen (7500 x g; 5 min; 2-8°C).

Der Überstand wurde erneut verworfen und das RNA-Pellet für 5-10 min luftgetrocknet. Danach wurde die RNA in 100 μ l RNase-freiem destilliertem Wasser resuspendiert, für 10 min bei 55-60°C inkubiert und danach bei -80°C aufbewahrt.

3.20.2 Aufreinigung der isolierten RNA

Die Isolierung der mit TRIZOL[®] aufgereinigten RNA und der Verdau eventuell noch vorhandener DNA mittels RNase-freier DNase wurde mit NucleoSpin[®] RNA II nach dem Standardprotokoll der Firma Macherey-Nagel durchgeführt.

3.20.3 Real Time SYBR Green PCR (One Step)

Im Gegensatz zu konventionellen Polymerasekettenreaktionen (*Polymerase Chain Reaction*; PCR) können PCR-Produkte mit der Echtzeit-PCR (*Real Time*) während der Amplifikation quantitativ erfasst werden. Die Quantifizierung der PCR-Produkte erfolgt mit dem fluoreszierenden Farbstoff SYBR Green I, welcher in die dsDNA interkaliert. Die emittierte Fluoreszenz der PCR-Produkte wird durch eine Photozelle aufgezeichnet und kann von Zyklus zu Zyklus verfolgt werden. Die Quantifizierung unbekannter Mengen an PCR-Produkten erfolgt über die Korrelation der Fluoreszenz mit der Fluoreszenz eines Standardgens (β -Actin), dessen Kopienzahl bekannt ist.

In der Initialphase (52°C) wurde zunächst cDNA aus mRNA mittels reverser Transkriptase synthetisiert und die Synthese anschließend bei 95°C gestoppt. Daraufhin folgte die Amplifikationsphase, in welcher die cDNA mit Hilfe spezifischer Oligonukleotide und der DNA-Polymerase vervielfältigt wurde. Als nächster Schritt erfolgte eine Schmelzpunktanalyse der amplifizierten cDNA durch Erhitzen der Proben von 60°C auf 95°C statt. Jedes Fragment besitzt einen spezifischen Schmelzpunkt, bei dem die dsDNA in ssDNA denaturiert. Dieser Vorgang wurde photoelektrisch dokumentiert und lieferte Aufschluss über amplifizierte Nebenprodukte, wie Kontaminationen oder dimerisierte Oligonukleotide.

Der Mastermix für die Durchführung der quantitativen RT-PCR wurde wie folgt zusammen pipettiert:

10 μl	RT-Master (2x)
0,8 μl	H₂O
4 μl	3' Oligonukleotide (10 μM)
4 μl	5' Oligonukleotide (10 μM)
0,2 μl	RT-Mix
Σ 19 μl	Mastermix

19 μ l des Mastermixes wurden pro Probe in eine MicroAmp 48-Well Reaktionsplatte vorgelegt und im Anschluss wurde 1 μ l isolierte RNA hinzupipettiert. Als Negativkontrolle wurde 1 μ l H₂O anstatt RNA eingesetzt. Die Reaktionsplatte wurde bei 300 x g (15 sec) zentrifugiert und in dem StepOne™ Real Time PCR Gerät platziert. Die Herstellung des Mastermixes und die weitere Verarbeitung erfolgten auf Eis.

Als Standard für die Quantifizierung der jeweiligen PCR-Produkte wurde eine 1:10 Verdünnungsreihe des β -Actin mRNA Standards mit bekannter Konzentration verwendet. Die PCR wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Initialphase	52°C; 10 min		
	95°C; 30 min		
Amplifikationsphase	94°C; 20 s	}	42x
	53°C; 25 s		
	72°C; 40 s		
Schmelzphase	94°C; 15 s		
	60°C; 60 s		
	95°C; 15 s		
Kühlung	38°C; 60 s		

Die Temperaturänderungsrate lag bei 20°C/s. Nur während des Schmelzprozesses wurde eine Änderungsrate von 0,3°C/s verwendet.

3.20.4 Real Time TaqMan-PCR

Neben dem Einsatz von SYBR Green besteht die Möglichkeit, eine spezielle fluoreszenzmarkierte Oligonukleotid-Sonde zu verwenden, die zur Erhöhung der Spezifität beiträgt. Diese ist am 5'-Ende mit einem fluoreszenten Reporter-Farbstoff (Fluoreszein-Derivat) markiert und trägt am 3'-Ende einen Quencher Farbstoff (Rhodamin-Derivat), der zusätzlich mit einem Phosphatrest blockiert ist. Bei Anregung der intakten Sonde bei einer spezifischen Wellenlänge (488 nm) wird deren Fluoreszenz durch die räumliche Nähe von Reporterfarbstoff zum Quencher-Farbstoff durch einen Fluoreszenz-Energietransfer (FRET) unterdrückt. Während der PCR hybridisieren Sonde und Oligonukleotide gleichermaßen an den Matrizenstrang. In der Extensionsphase kommt es zur Hydrolyse der Sonde durch die 5'-3'Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase, wobei die räumliche Nähe zwischen Reporter und Quencher unterbrochen und die Emission des Reporters als Signal gemessen werden kann. Freie, nicht gebundene Sonde wird nicht hydrolysiert. Die

Fluoreszenz des Reporters steigt entsprechend der Akkumulation des PCR-Produkts mit jedem Zyklus an.

3.20.5 *Two Step* TaqMan-PCR für die Quantifizierung von Friend Virus

Bei der *Two Step* RT-PCR wurde zunächst während der reversen Transkription die cDNA (*complementary DNA*) synthetisiert. Nach Abschluss der Reversen Transkription wurde dann ein Aliquot draus entnommen und in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Der wesentliche Vorteil der zweistufigen RT-PCR liegt darin, dass die PCR optimiert werden kann, ohne dass die Reverse-Transkription beeinflusst wird.

1. cDNA-Synthese

Zur Auffaltung der Sekundärstrukturen (intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen) wurden 10 µl RNA mit 2,5 µl antisense Primer 5 min bei 70°C erhitzt und danach auf Eis inkubiert.

Folgender PCR-Mastermix wurde danach pro Probe pipettiert:

10 µl	RT-Master (2x)
2,8 µl	H₂O
1 µl	TaqMan-Sonde (4 pmol/µl)
0,2 µl	RT-Mix
5 µl	Probe (von zuvor angesetzten 12,5 µl RNA + antisense Oligonukleotid))

Nun folgte die Synthese der cDNA mittels reverser Transkriptase bei 50°C für 20 min und der Stopp der Synthese bei 94°C für 5 min. Als Negativprobe wurde H₂O stets mitgeführt.

2. Real Time-PCR

In die MicroAmp 48-Well Reaktionsplatte wurde 1 µl des Oligonukleotids (*sense*) vorgelegt und dann wurden 19 µl des cDNA-Synthese Ansatzes zugegeben.

Aktivierung Hot-Start	95°C	15 min		
Cycling	96°C	15 s	}	45x
	53°C	60 s		
Kühlung	4°C	30 s		

Die Temperaturänderungsrate lag bei 20°C/s.

Als Standard für die Quantifizierung der jeweiligen Echtzeit-PCR Produkte wurde eine 1:10 Verdünnungsreihe der Friend Virus RNA mit bekannter Konzentration verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Induktion von Typ I Interferon in FV-infizierten Mäuse nach Poly I:C-Injektion

Von früheren Arbeiten ist bekannt, dass während der FV-Infektion kein IFN α - Protein im Plasma von infizierten Mäusen nachweisbar ist (67). Es wurde außerdem gezeigt, dass eine exogene Applikation von IFN α zu einer Reduzierung der Viruslast in der akuten FV-Infektion und zu einer Verstärkung der virus-spezifischen Immunantwort führt (65, 67). Der Nachteil der exogenen Gabe von IFN α liegt in der sehr kurzen Halbwertszeit dieses Proteins (199), so dass IFN α für therapeutische Anwendungen täglich appliziert werden muss. Daher ist es vom Vorteil die IFN α -Produktion endogen zu induzieren. Es stellte sich nun die Frage, ob eine gezielte endogene Induktion von IFN α antivirale Effekte und zusätzlich eine Modulation der virus-spezifischen Immunantwort bewirken würde. Dazu wurde zunächst Y10A-Mäusen während der akuten FV-Infektion Poly I:C injiziert (i.p.). Poly I:C ist ein artifizieller Ligand für den in den Endosomen lokalisierten TLR3 und den im Zytosol befindlichen Rezeptor MDA5 (102). Poly I:C imitiert doppelsträngige RNA, wodurch es von beiden Rezeptoren erkannt wird. Es ist bekannt, dass Poly I:C eine starke IFN α -Antwort in naiven Mäusen induziert (6), so dass zuerst überprüft wurde, ob eine Poly I:C-Gabe während einer akuten FV-Infektion die Expression von IFN α hervorruft. Wie in Abbildung 4.1 zu sehen ist, erfolgte durch die exogene Applikation von 125 μ g Poly I:C pro Maus eine starke Induktion von IFN α im Plasma FV-infizierter Mäuse (im Durchschnitt 1780 pg/ml an Tag 5 bzw. 2300 pg/ml an Tag 9 nach FV-Infektion). Die Analyse der IFN α -Konzentration erfolgte 24 h nach Poly I:C-Gabe. Zusätzlich wurde einer FV-infizierten Kontrollgruppe steriles H₂O injiziert. Ohne Poly I:C war IFN α im Plasma nicht nachweisbar (Abbildung 4.1; Gruppe FV).

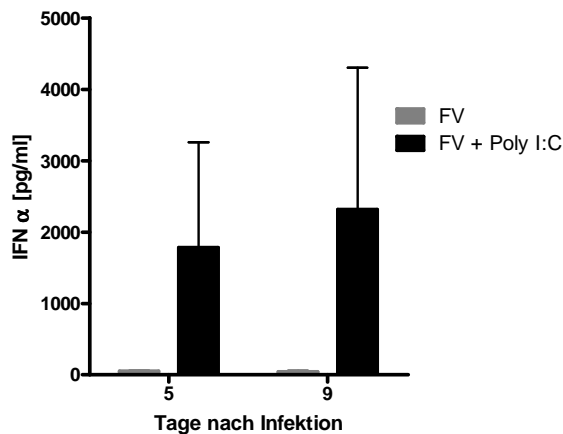


Abbildung 4.1 IFNα-Konzentration im Plasma von FV-infizierten Mäusen nach Poly I:C-Gabe

Suszeptible Y10A-Mäuse wurden mit FV infiziert und an Tag 4 und 8 nach Infektion mit 125 µg Poly I:C i.p. behandelt. Plasma wurde 24 h nach Poly I:C-Injektion entnommen. Die IFNα-Konzentrationen im Plasma wurden mittels ELISA bestimmt. Die Mittelwerte von sechs Mäusen pro Gruppe mit Standardabweichung (SEM) sind gezeigt.

4.2 Poly I:C-Behandlung in der akuten FV-Infektion bewirkt eine Reduktion der Viruslast

Da Poly I:C zu einer endogenen Expression von IFNα in FV-infizierten Mäusen führte, wurde im Weiteren der Effekt des TLR3/MDA5 Liganden auf den Verlauf der Infektion untersucht.

Dazu wurde wie in Abbildung 4.2 schematisch dargestellt Y10A-Mäuse mit 5000 SFFU FV infiziert und an den Tagen 4 und 8 nach Infektion erfolgte eine intraperitoneale Injektion von 125 µg Poly I:C. 2 Tage nach der letzten Poly I:C-Verabreichung erfolgte die Untersuchung der Tiere. Dazu wurde den Mäusen Blut und Milz entnommen und auf die Viruslast hin untersucht. Als Kontrolle wurden Mäuse verwendet, welchen anstelle von Poly I:C H₂O injiziert wurde.

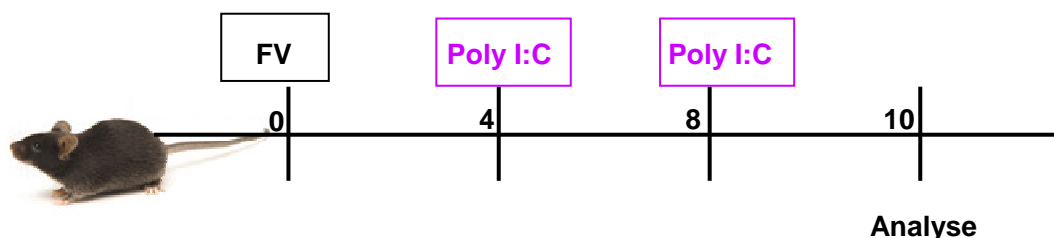


Abbildung 4.2 Versuchsablauf der Poly I:C-Behandlung in der akuten FV-Infektion

Suszeptiblen Mäusen wurde zu den Zeitpunkten 4 und 8 Tage nach FV-Infektion 125 µg Poly I:C i.p. injiziert. 10 Tage nach der Infektion wurden die Mäuse getötet und das Milzgewicht, die Anzahl der infektiösen Zellen in der Milz und die Plasmavirämie bestimmt.

In Abbildung 4.3 sind die Auswirkung der Behandlung mit Poly I:C auf das Milzgewicht (A), als Indikator für die durch das FV induzierte Erkrankung, und die Viruslast in der akuten FV-Infektion in Milz (B) und Blut (C) gezeigt. In suszeptiblen Mäusen wie z.B. Y10A-Mäusen führte eine Infektion mit dem FV zu einer schweren Splenomegalie, so dass die Milz in der akuten Phase der Infektion 20- bis 30-fach vergrößert ist. Anhand der Milzgröße lassen sich somit Rückschlüsse auf die Schwere der Virusinfektion ziehen (80).

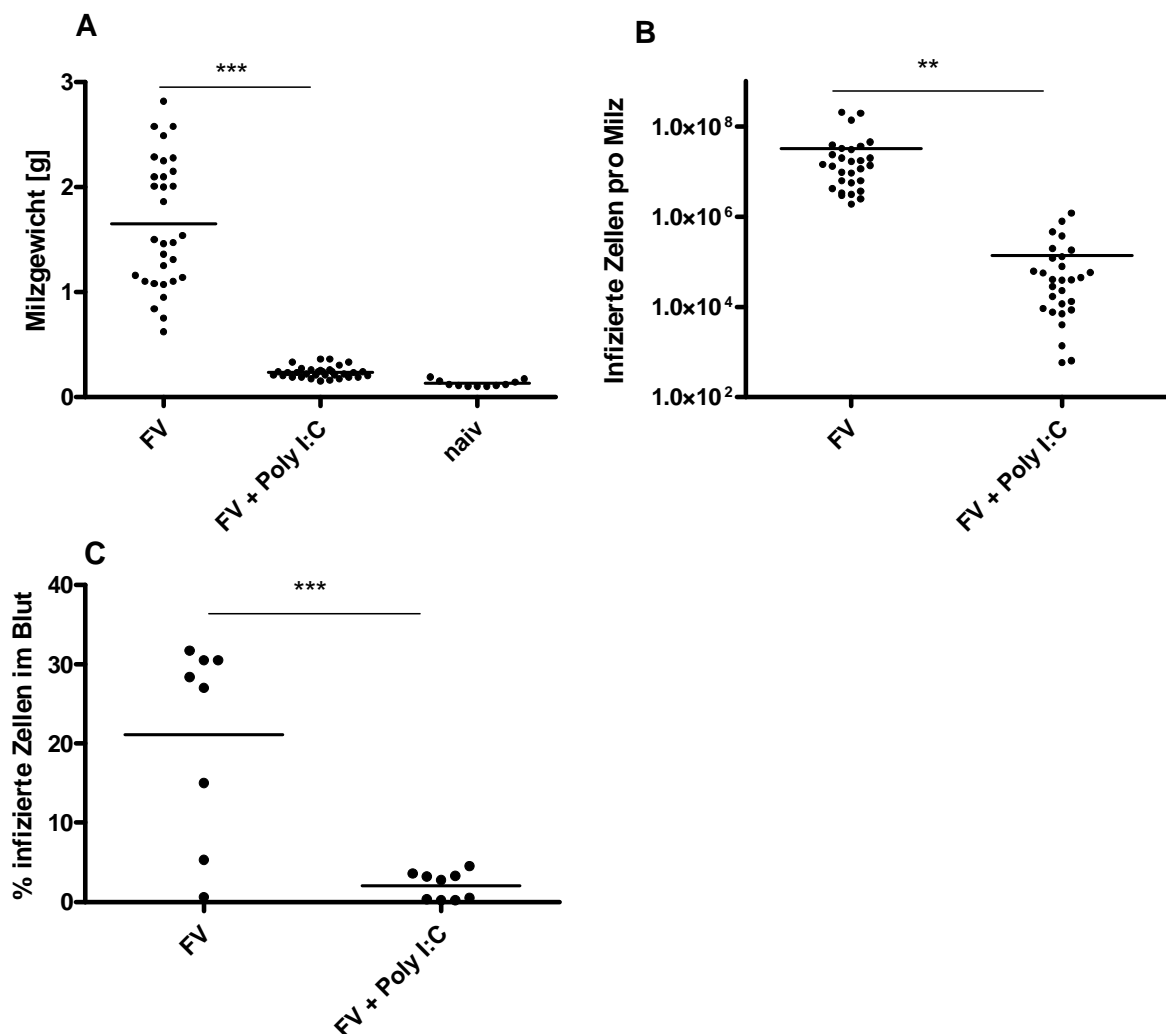


Abbildung 4.3 Milzgewichte und Viruslast nach Poly I:C-Therapie in der akuten FV-Infektion

Suszeptible Y10A-Mäuse wurden zweimal mit Poly I:C an den Tagen 4 und 8 nach Infektion mit FV behandelt. 10 Tage nach Infektion wurde das Milzgewicht (A), die Anzahl der infektiösen Zellen in der Milz mittels „Infectious center assays“ (B) und die Plasmavirämie (C) bestimmt. 30 Mäuse pro Gruppe wurden in der akuten Infektion auf ihre Viruslast in der Milz bzw. 8 Mäuse pro Gruppe für die Plasmavirämie untersucht und die Mittelwerte für jede Gruppe sind durch einen Querbalken dargestellt. Die Unterschiede zwischen den Poly I:C-behandelten Mäusen und den Kontrollen wurden mit Hilfe des „student t Test“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt durch * < 0,05; ** < 0,005; *** < 0,0005.

Die akute FV-Infektion führte in suszeptiblen Mäusen zu einem durchschnittlichen Milzgewicht von 1,65 g, wogegen naive Mäuse ein Milzgewicht von etwa 0,13 g aufwiesen (Abbildung 4.3 A). Durch die Behandlung mit Poly I:C wurde die Entstehung der Splenomegalie verhindert und die Mäuse hatten an Tag 10 der Infektion ein durchschnittliches Milzgewicht von 0,23 g, welches im Vergleich zu naiven Tieren nicht signifikant erhöht war.

Die Viruslast in den Poly I:C-behandelten Mäusen war stark reduziert. In der Milz war die Viruslast in den therapierten Tieren (im Mittel: $1,4 \times 10^5$ infizierte Zellen in der Milz) um den Faktor 200 niedriger als in den unbehandelten Mäusen (im Mittel: $3,2 \times 10^7$ infizierte Zellen in der Milz; Abbildung 4.3 B). Auch die Anzahl der infizierten Zellen im Blut war nach der Gabe von Poly I:C etwa um das 10-fache reduziert (2%) verglichen zu den infizierten Kontrollen (21%). Hiermit konnte also gezeigt werden, dass eine Therapie mit Poly I:C zu einer starken Abnahme der Viruslast führte und die Entwicklung einer Splenomegalie in der akuten FV-Infektion verhinderte.

Nun stellte sich die Frage, ob die beobachteten Effekte nur abhängig von der endogenen Induktion von IFN α sind oder von der Expression anderer Moleküle, die möglicherweise durch Poly I:C induziert werden. Um dies zu beantworten wurde der Versuchsablauf wie zuvor beschrieben (Abbildung 4.2) in Tieren durchgeführt, welche keinen Rezeptor für IFN α besitzen (IFNAR $^{-/-}$). Diese Tiere haben einen anderen genetischen Hintergrund als die zuvor verwendeten Y10A-Mäuse, so dass als Kontrollen Tiere gleichen genetischen Hintergrundes (C57BL/6) verwendet wurden. Diese Tiere sind resistent gegenüber der FV-induzierten Splenomegalie und der im weiteren Verlauf induzierten Erythroleukämie. Die resistenten Mäuse können aber das Virus nicht komplett eliminieren und somit entwickelte sich eine chronische Infektion. Die Knockout-Tiere und die Kontrollen wurden mit 20.000 SFFU FV infiziert und wie bereits beschrieben (Abbildung 4.2) an den Tagen 4 und 8 nach Infektion mit 125 μ g Poly I:C behandelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.4 gezeigt.

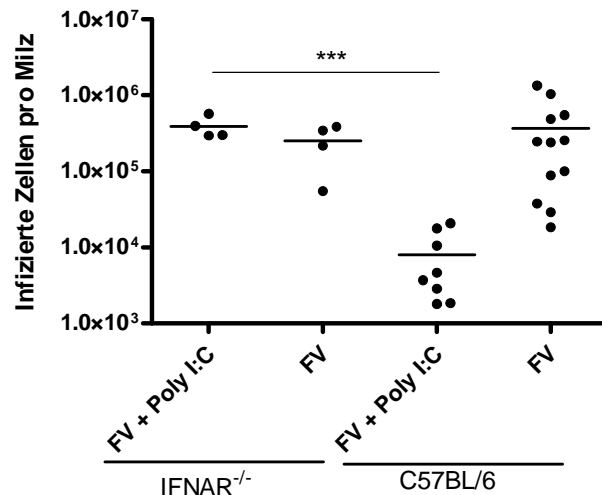


Abbildung 4.4 Poly I:C-Therapie in IFN α Rezeptor-Knockout-Mäusen

Mäuse mit einer Deletion des IFN- α/β -Rezeptors (IFNAR^{-/-}) und Wildtyp-Mäuse (C57BL/6) wurden zweimal mit Poly I:C an den Tagen 4 und 8 nach Infektion mit FV behandelt. 10 Tage nach Infektion wurde die Viruslast in der Milz mittels „Infectious center assay“ analysiert. Mindestens 4 Mäuse pro Gruppe wurden in der akuten Infektion auf ihre Viruslast in der Milz untersucht und die Mittelwerte für jede Gruppe sind durch einen Querbalken dargestellt. Die Unterschiede zwischen den Poly I:C-behandelten Mäusen und den Kontrollen wurden mit Hilfe des „student t Test“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt durch * < 0,05; ** < 0,005; *** < 0,0005.

Auch in resistenten Mausstämmen (C57BL/6) führte die Poly I:C-Therapie zu einer Verringerung der Viruslast um den Faktor 50 (von durchschnittlich $3,7 \times 10^5$ infizierten Zellen pro Milz in unbehandelten Mäusen auf 8×10^3 infizierte Zellen in der Milz von therapierten Tieren). Die unbehandelten Knockout-Mäuse wiesen eine ähnliche Viruslast auf ($2,5 \times 10^5$ infizierte Zellen pro Milz) wie die Kontrolltiere. Die Injektionen von Poly I:C führten jedoch zu keiner Reduktion der Viruslast (durchschnittlich $3,9 \times 10^5$ infizierte Zellen pro Milz) in den Knockout-Mäusen, so dass die beobachteten Effekte von Poly I:C (siehe Abbildung 4.3) abhängig von IFN α sind. Wenn der Rezeptor nicht mehr vorhanden ist, kann das induzierte IFN α nicht mehr gebunden werden und somit nicht die Aktivierung und Expression anderer Gene mit antiviraler Wirkung induzieren.

4.3 Poly I:C-Behandlung verhindert die Entstehung einer letalen Erythroleukämie

Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Poly I:C während der akuten FV-Infektion zu einer starken Reduktion der Viruslast führte und eine Splenomegalie

verhinderte. Dadurch ergibt sich nun die Frage, wie lang anhaltend diese Effekte sind. In suszeptiblen Mäusen führt die Infektion mit FV nach etwa 6 Wochen zu der Entstehung einer letalen Leukämie (81, 137, 157). Im Folgenden wurde die Leukämieentwicklung von infizierten Mäusen nach Behandlung mit Poly I:C untersucht. Der Versuch wurde wie in Abbildung 4.5 dargestellt durchgeführt. Dazu wurden die Tiere in der akuten Phase der Infektion mit Poly I:C behandelt und danach wöchentlich ihre Milzgröße untersucht (siehe 3.1.6). 7 Wochen nach Infektion wurden den Mäusen die Milzen entnommen und diese auf ihre Viruslast und die Entstehung einer Erythroleukämie hin analysiert.

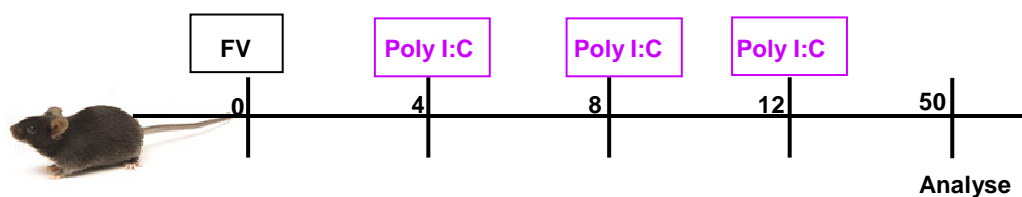


Abbildung 4.5 Versuchsablauf der Langzeitstudie nach Poly I:C-Therapie

Suszeptiblen Mäusen wurden zu den Zeitpunkten 4, 8 und 12 Tage nach FV-Infektion 125 µg Poly I:C i.p. injiziert. 7 Wochen nach der Infektion wurden die Mäuse getötet und die Anzahl der infektiösen Zellen in der Milz bestimmt. Durch wöchentliches Palpieren über den gesamten Zeitraum wurde der Verlauf der FV-induzierten Splenomegalie dokumentiert.

In Abbildung 4.6 ist gezeigt, wie sich die Poly I:C-Behandlung in der akuten Phase der Infektion auf den Krankheitsverlauf einer FV-Infektion auswirkt. Das wöchentliche Palpieren ergab, dass die unbehandelten Kontrolltiere an Tag 12 eine Milzgröße von 4 aufwiesen, was einem Milzgewicht ab 1,7 g entspricht. Die therapierten Mäuse hatten dagegen an Tag 12 eine Milzgröße von 1, was ein Gewicht unter 0,5 g bedeutet. Bis zum Ende der Beobachtung (7 wpi) behielten die Tiere, welche Poly I:C bekamen, diese Milzgröße. 3-4 Wochen nach Infektion (25 dpi) zeigten die untherapierten Mäuse im Durchschnitt eine leichte Abnahme der Milzgröße unter den Wert 3, was einem Gewicht von 0,8 bis 1,7 g entspricht und somit immer noch eine Splenomegalie anzeigt. Die Behandlung mit Poly I:C in der akuten Phase der Infektion verhinderte also langfristig die Entstehung einer Splenomegalie.

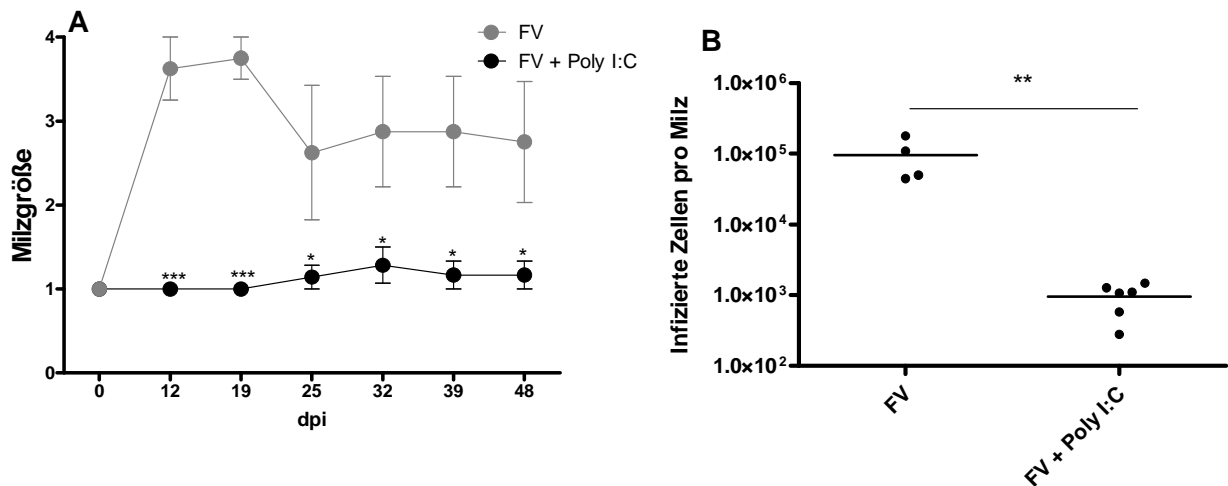


Abbildung 4.6 Langzeitbeobachtung der Poly I:C-Behandlung

Suszeptible Y10A-Mäuse wurden dreimal mit Poly I:C an den Tagen 4, 8 und 12 nach Infektion mit FV behandelt. 7 Wochen nach Infektion wurde die Anzahl der infektiösen Zellen in der Milz mittels „Infectious center assays“ (B) bestimmt. Als Indikator für die virus-induzierte Erkrankung wurde die Milzgröße der Tiere wöchentlich durch Palpieren bestimmt. 4 Mäuse pro Gruppe wurden untersucht und die Mittelwerte für jede Gruppe sind durch einen Querbalken dargestellt. Die Unterschiede zwischen den Poly I:C-behandelten Mäusen und den Kontrollen wurden mit Hilfe des „student t Test“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt durch * < 0,05; ** < 0,005; *** < 0,0005.

Zusätzlich zur wöchentlichen Untersuchung der Milzgrößen wurde nach 7 wpi die Viruslast in der Milz bestimmt (siehe Abbildung 4.6 B.). Die therapierten Tiere hatten eine stark verminderte Viruslast ($9,6 \times 10^2$ infizierte Zellen pro Milz) im Vergleich zu den nicht behandelten Kontrolltieren ($9,5 \times 10^4$ infizierte Zellen pro Milz). Es handelt sich dabei um eine Reduktion um den Faktor 100, welcher ähnlich auch in der akuten Infektion zu finden war (Abbildung 4.3). Die Therapie mit Poly I:C in der akuten FV-Infektion führte zu einer langfristigen Reduktion der Viruslast.

Als nächstes folgte die Beantwortung der Frage, ob eine frühe Poly I:C-Gabe die der Entwicklung einer letalen Leukämie schützt. Während einer FV-Infektion von werden Ter119⁺ Erythrozytenvorläuferzellen durch das Virus transformiert, was die Leukämie zur Folge hat (99). Ein Anstieg der Anzahl von Ter119⁺ Zellen in FV-daher ein Indikator für die Leukämieentstehung. Die in der akuten Infektion (Abbildung 4.5) wurden 7 wpi auf die Anzahl der Ter119⁺ Zellen in der Milz analysiert. Wie in Abbildung 4.7 zu sehen ist, lag der prozentuale Anteil an Ter119⁺ Zellen in naiven Tieren bei 5%. In einer infizierten Maus lag der Anteil der Ter119⁺ Zellen bei ca. 70%, wohingegen die Behandlung mit Poly I:C eine klonale Proliferation der

Erythrozytenvorläuferzellen verhinderte. Ihr Anteil in der Milz lag in den behandelten Tieren nur bei 5%, was dem Ergebnis in den naiven Tieren entsprach.

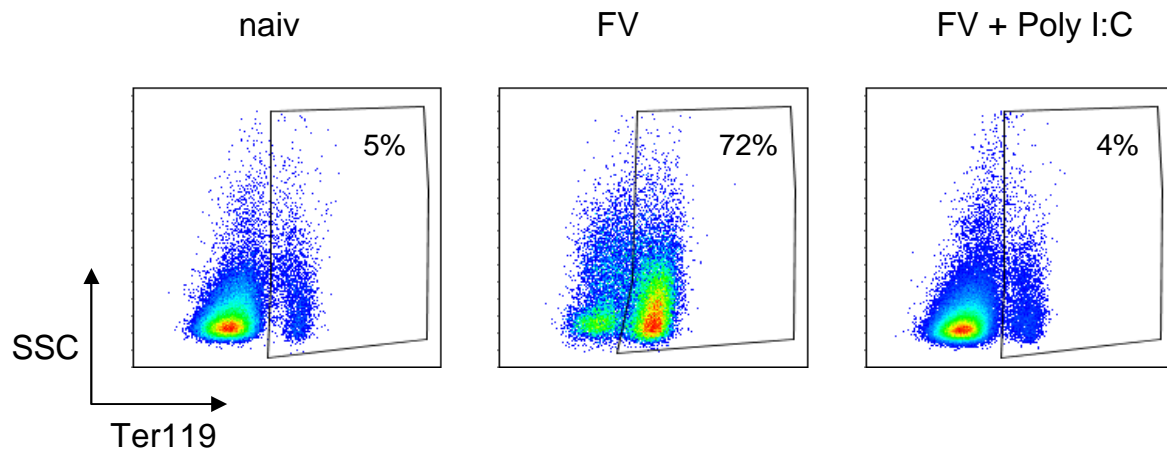


Abbildung 4.7 Auswirkung der Poly I:C-Behandlung auf eine Leukämieentstehung

Susceptible Y10A-Mäuse wurden dreimal mit Poly I:C an den Tagen 4, 8 und 12 nach Infektion mit FV behandelt. 7 Wochen nach Infektion wurde die Entstehung einer Erythroleukämie durch Anfärbung der Erythrozyten mit einem Antikörper gegen Ter119 analysiert. Dotplots zeigen die Untersuchung der durchflusszytometrischen Analyse des prozentualen Anteils der Ter119⁺ Zellen in der Milz. 4 Mäuse pro Gruppe wurden untersucht und für jede Gruppe ist ein Tier exemplarisch dargestellt.

Somit verhindert eine Behandlung mit Poly I:C während der akuten Infektion die Entstehung einer letalen Erythroleukämie durch das FV.

4.4 Poly I:C-Behandlung in der chronischen FV-Infektion bewirkt eine Reduktion der Viruslast

Es wurde gezeigt, dass eine Behandlung mit Poly I:C in der akuten FV-Infektion zu einer Verminderung der Viruslast führte, eine Splenomegalie verhinderte und die Mäuse vor dem Ausbruch einer Leukämie schützte. Auch in der chronischen Infektion mit FV ist kein IFN α nachweisbar. Daher wurde als nächstes untersucht, ob eine Induktion von endogenem IFN α durch die Gabe von Poly I:C in der chronischen FV-Infektion einen therapeutischen Effekt hat. Dazu wurden resistente Mäuse (C57BL/6) mit 15.000 SFFU FV infiziert. Diese Mäuse entwickelten nach circa 6 Wochen eine chronische Infektion, mit stabiler Viruslast. Dazu wurde wie in Abbildung 4.8 schematisch dargestellt eine resistente Maus mit FV infiziert und nach 6 Wochen wurden die Mäuse zweimal im Abstand von 4 Tagen mit Poly I:C behandelt. Nach der Behandlung wurden die Milzen der Tiere auf ihre Viruslast hin untersucht. Als Kontrolle dienten chronisch infizierte unbehandelte Mäuse.

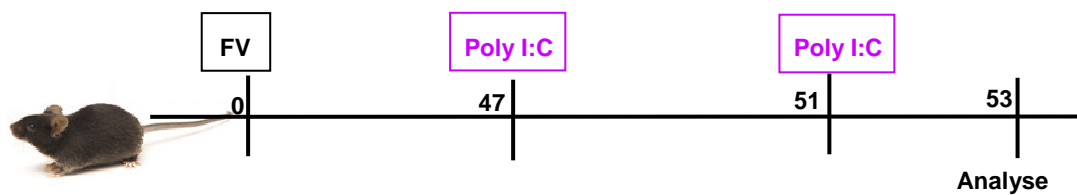


Abbildung 4.8 Versuchsablauf der Poly I:C-Behandlung in der chronischen FV-Infektion

Resistenten Mäusen wurde 6 Wochen nach Infektion mit FV zweimal in einem Abstand von 4 Tagen 125 µg Poly I:C i.p. injiziert. 2 Tage nach der 2. Behandlung wurden die Mäuse getötet und die Anzahl der infektiösen Zellen in der Milz bestimmt.

Wie in Abbildung 4.9 zu sehen ist, führt die Induktion von IFN α in der chronischen Infektion zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl infizierter Zellen in der Milz (durchschnittlich 7500 infizierte Zellen in der Milz von unbehandelten Mäusen und 1000 infizierte Zellen in der Milz von therapierten Mäusen). Somit bewirkte eine Behandlung mit Poly I:C in der chronischen Phase der FV-Infektion eine Verringerung, jedoch keine vollständige Eliminierung der Viruslast in der Milz.

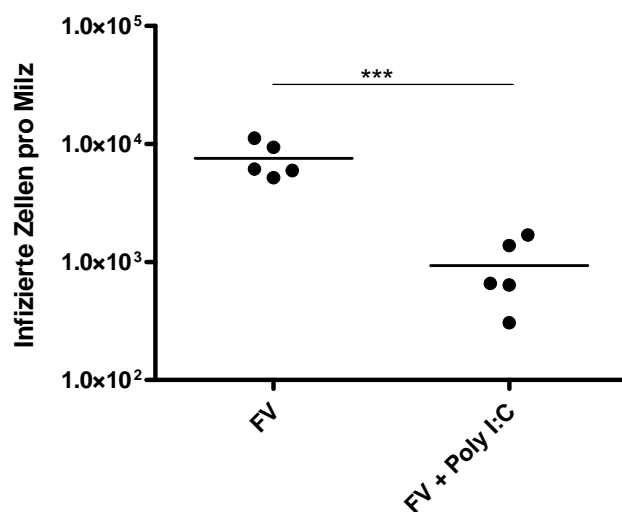


Abbildung 4.9 Poly I:C-Therapie in der chronischen FV-Infektion

Resistenten Mäusen wurde 6 Wochen nach Infektion mit FV zweimal in einem Abstand von 4 Tagen 125 µg Poly I:C i.p. injiziert. 2 Tage nach der 2. Behandlung wurden die Mäuse getötet und die Anzahl der infektiösen Zellen in der Milz mittels „Infectious center assay“ bestimmt. 5 Mäuse pro Gruppe wurden in der chronischen Infektion auf ihre Viruslast in der Milz untersucht und die Mittelwerte für jede Gruppe sind durch einen Querbalken dargestellt. Die Unterschiede zwischen den Poly I:C-behandelten Mäusen und den Kontrollen wurden mit Hilfe des „student t Test“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt durch * < 0,05; ** < 0,005; *** < 0,0005.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Poly I:C in der chronischen wie auch in der akuten FV-Infektion eine starke Verringerung der Viruslast in der Milz hervorrief. Des Weiteren sollen nun die genauen Mechanismen, welche der erfolgreichen antiretroviralen Therapie mit Poly I:C zugrunde liegen, untersucht werden.

4.5 Direkte antivirale Effekte von Poly I:C

Um die Mechanismen der Reduktion der Viruslast durch Poly I:C genauer zu analysieren, wurde zunächst der direkte antiretrovirale Effekt von Poly I:C untersucht. Dazu wurden B-Zellen, welche ein natürliches Reservoir für das FV während der Infektion darstellen (50), aus einer infizierten Maus (10 dpi) isoliert und *in vitro* mit Poly I:C für 24 h bzw. 48 h stimuliert. Nach der Stimulation wurde die Gesamt-RNA der Zellen isoliert und die Viruslast an Hand der FV-RNA in den Proben quantifiziert. Wie in Abbildung 4.10 A zu sehen ist, führte eine Stimulation der B-Zellen suszeptibler Mäuse mit Poly I:C zu einer Abnahme der FV-RNA Moleküle (schwarze Balken; durchschnittlich 7×10^5 nach 24 h bzw. 2×10^5 FV-RNA Moleküle nach 48 h Stimulation) verglichen mit der unstimulierten Kontrolle (graue Balken; durchschnittlich 3×10^6 nach 24 h bzw. 4×10^6 FV RNA Moleküle nach 48 h). Um zu untersuchen, ob der antiretrovirale Effekt von Poly I:C abhängig von der Induktion von IFN α ist, wurden auch aus FV-infizierten IFN α Rezeptor-defizienten Mäusen (IFNAR^{-/-}) B-Zellen isoliert und diese in der gleichen Versuchsanordnung mit Poly I:C stimuliert. Es ist zu sehen, dass bei den B-Zellen der Knockout-Mäuse eine Stimulation mit Poly I:C nicht zu einer Abnahme der Viruslast führte. Die Anzahl der FV-RNA Moleküle in beiden Populationen war nicht signifikant verändert (graue und weiße schraffierte Balken). Der direkte antivirale Effekt von Poly I:C auf infizierte B-Zellen war also abhängig von der IFN α -Induktion.

Die Anzahl der FV-RNA Moleküle war in den Knockout-Mäusen etwa um den Faktor 10 geringer als in den Wildtyp-Mäusen (durchschnittlich 3×10^6 zu 3×10^5 nach 24 h bzw. 4×10^6 zu 3×10^5 FV-RNA Moleküle nach 48 h), da es sich bei beiden Gruppen um Mäuse mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund handelt. Die Wildtyp-Mäuse waren suszeptible Mäuse (Y10A), welche generell eine höhere Viruslast aufweisen als resistente Tiere (C57BL/6) (35). Da hier aber die Unterscheidung zwischen den unstimulierten Zellen und denjenigen nach Poly I:C-Stimulation wichtig

ist, ist der unterschiedliche genetische Hintergrund der verschiedenen Versuchsgruppen für die Frage nicht weiter relevant.

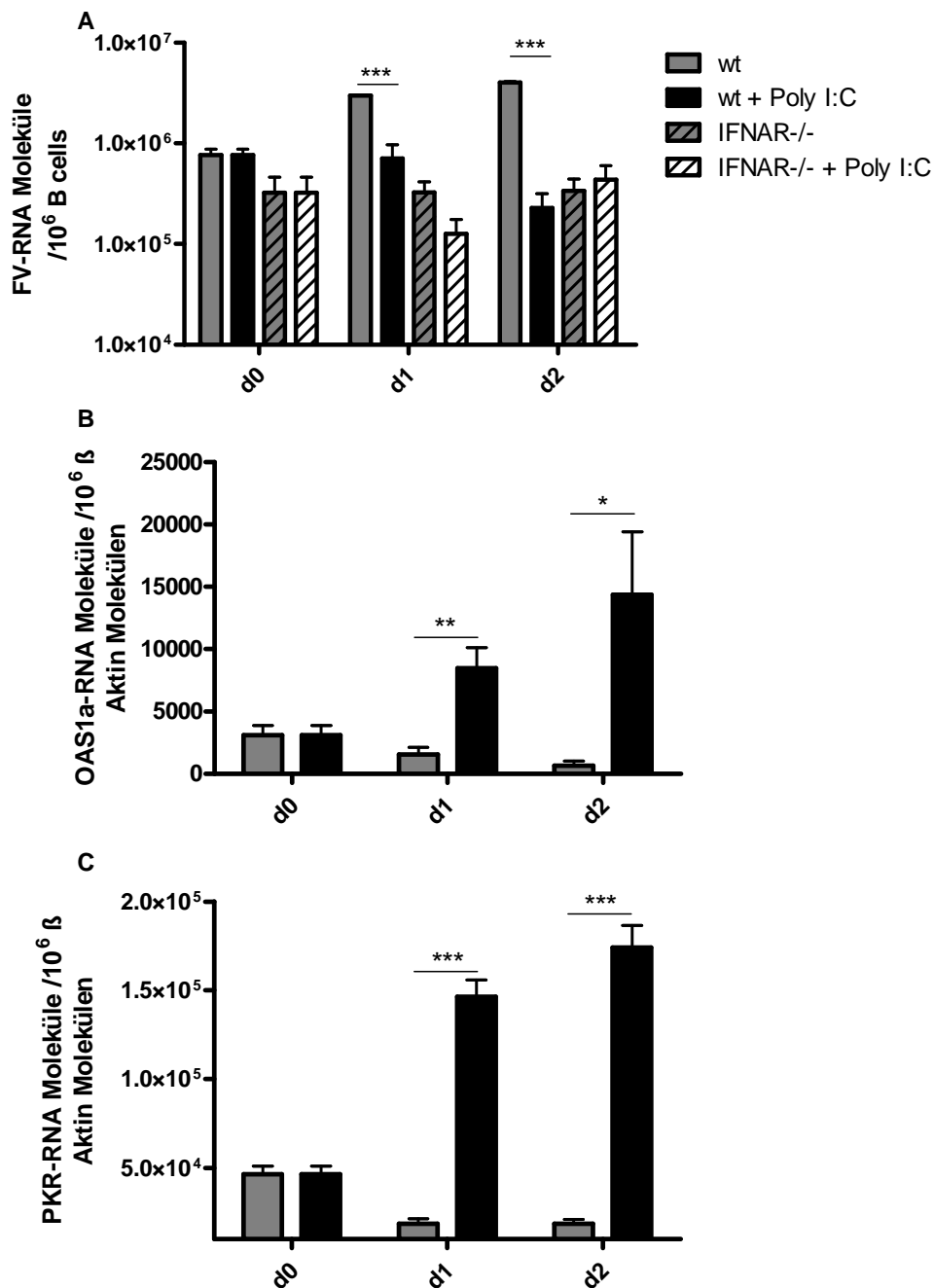


Abbildung 4.10 Direkte antivirale Effekte von Poly I:C und die Expression von OAS1a und PKR mRNA

Suszeptible Y10A-Mäuse und IFNAR^{-/-} Mäuse wurden mit FV infiziert. 10 Tage nach Infektion wurden CD19⁺ B-Zellen mittels FACS Sortierung aus den Milzen von 4 infizierten Mäusen pro Gruppe isoliert. Die B-Zellen wurden mit Poly I:C für 2 Tage in Zellkultur stimuliert oder blieben unstimuliert. Jeden Tag wurden die Zellen geerntet und die Gesamt-RNA wurde mit TRIZOL[®] isoliert. Die Anzahl der Moleküle von FV-RNA (A), OAS1a mRNA and PKR mRNA (B) wurden mittels quantitativer Echtzeit-PCR bestimmt. Mindestens 2 unabhängige Experimente wurden durchgeführt und die Proben wurden jeweils in Doppelbestimmungen untersucht. Der Durchschnitt von 4 Mäusen pro Gruppe (+ SEM) ist gezeigt. Die Unterschiede zwischen den Poly I:C-behandelten Mäusen und den Kontrollen wurden mit Hilfe des „student t Test“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt durch * < 0,05; ** < 0,005; *** < 0,0005.

IFN α induziert nach der Bindung an seinen Rezeptor die Expression vieler verschiedener IFN-stimulierter Gene (ISG), welche einen antiviralen Zustand in der infizierten Zelle etablieren (45). Manche dieser Gene kodieren für Proteine mit antiviralen Eigenschaften wie z.B. Proteinkinase R (PKR), 2'-5'-Oligoadenylatsynthetase (OAS1a) oder Mx Proteine. PKR inhibiert die Initiation der Translation (132), wohingegen OAS1a die Degradation von viraler RNA aktiviert (205). Um den antiviralen Mechanismus von Poly I:C zu untersuchen, wurde die Expression dieser antiviralen Proteine nach Stimulation mit Poly I:C untersucht. Wie in Abbildung 4.10 B und C zu erkennen ist, führte die Stimulation der B-Zellen von FV-infizierten Mäusen mit Poly I:C *in vitro* zu einer erhöhten Expression von OAS1a und PKR. So stieg im Falle von OAS1a die Expression in den stimulierten Zellen nach 24 h um ein 6-faches an (1500 RNA Moleküle in unstimulierten und 8500 RNA Moleküle in stimulierten B-Zellen) und nach 48 h um ein 20-faches (700 RNA Moleküle in unstimulierten und 14000 RNA Moleküle in stimulierten B-Zellen). Bei der Expression von PKR bewirkte die Stimulation mit Poly I:C eine 8 bis 10-fache Zunahme der Anzahl der PKR-RNA Moleküle im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen (18.000 RNA Moleküle in unstimulierten und 150.000 bzw. 180.000 RNA Moleküle in stimulierten B-Zellen). Somit wurde durch die endogene Induktion von IFN α durch Poly I:C eine Expression von ISG wie z.B. OAS1a und PKR hervorgerufen, welche dann direkt an der Hemmung der viralen Replikation beteiligt sein können.

4.6 Modulatorische Effekte von Poly I:C auf Immunzellen

4.6.1 Poly I:C-Behandlung in der akuten FV-Infektion erhöht die Anzahl an aktivierten B-Zellen

Abgesehen von der antiviralen Aktivität besitzt IFN α auch immunomodulatorische Eigenschaften. So kann es direkt NK und CD8⁺ T-Zellen stimulieren und die Reifung von Antigen-präsentierenden Zellen induzieren.

Daher wurde im nächsten Schritt untersucht, ob das induzierte IFN α einen modulatorischen Effekt auf Zellen des Immunsystems hat. Zu diesem Zweck wurden zunächst B-Zellen genauer untersucht, da diese über die Produktion von Antikörpern eine wichtige Rolle in der Kontrolle der FV-Infektion spielen (48, 128, 131).

Die Versuche wurden durchgeführt wie bereits schematisch in Abbildung 4.2 dargestellt. In der akuten Phase der FV-Infektion wurde die Wirkung von Poly I:C auf die Aktivierung von B-Zellen untersucht. Wie in Abbildung 4.11 gezeigt, führte die Behandlung mit Poly I:C in der akuten FV-Infektion zu einer erhöhten Anzahl von aktivierten (CD69⁺) B-Zellen (im Mittel: 100.000 CD69⁺ CD19⁺ B-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten) verglichen mit den unbehandelten Kontrollmäusen (im Mittel: 20.000 CD69⁺ CD19⁺ B-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten).

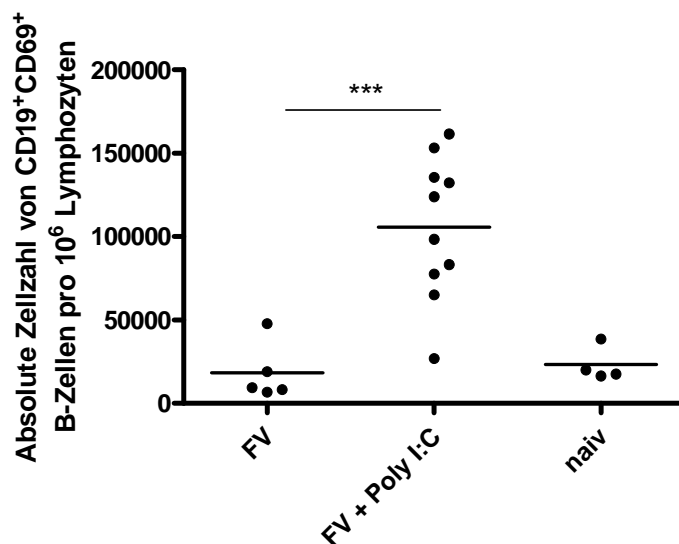


Abbildung 4.11 Untersuchung der Aktivierung von B-Zellen nach Poly I:C-Behandlung

Suszeptible Mäuse wurden zweimal mit Poly I:C an den Tagen 4 und 8 nach FV-Infektion behandelt. 10 Tage nach FV-Infektion wurden lebende Milzzellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Oberflächenexpression des Aktivierungsmarkers CD69 von CD19⁺ B-Zellen wurde untersucht. Die absolute Anzahl von aktivierten B-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten ist dargestellt. Mindestens 4 Mäuse pro Gruppe wurden untersucht und die Mittelwerte für jede Gruppe sind durch einen Querbalken dargestellt. Die Unterschiede zwischen den Poly I:C-behandelten Mäusen und den Kontrollen wurden mit Hilfe des „*student t Test*“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt durch * < 0,05; ** < 0,005; *** < 0,0005.

Weiterhin wurde untersucht, ob die B-Zellaktivierung durch Poly I:C einen Effekt auf die Bildung von bindenden oder neutralisierenden Antikörpern gegen das FV hat. An Tag 10 nach Infektion wurde das Plasma von behandelten und unbehandelten FV-infizierten Mäusen auf vorhandene Antikörper untersucht. Es konnten jedoch weder in den Poly I:C-behandelten noch in den unbehandelten Kontrolltieren bindende oder neutralisierende Antikörper detektiert werden. Wie auch bereits beschrieben, findet die Induktion von FV-neutralisierenden Antikörpern ab Tag 14 nach Infektion statt (128), was offensichtlich nicht durch Poly I:C verändert wurde.

Da B-Zellen neben der Produktion von Antikörpern auch noch andere wichtige Rollen in einer Immunantwort spielen, wie z.B. die Präsentation von Antigenen oder die Einleitung (*priming*) von T-Zellantworten, wurde eine Therapie mit Poly I:C in Mäusen durchgeführt, welche keine funktionalen B-Zellen besitzen ($JH^{-/-}$). Dadurch lässt sich untersuchen, ob B-Zellen unabhängig von ihrer Antikörperproduktion wichtig für die Therapie mit Poly I:C sind.

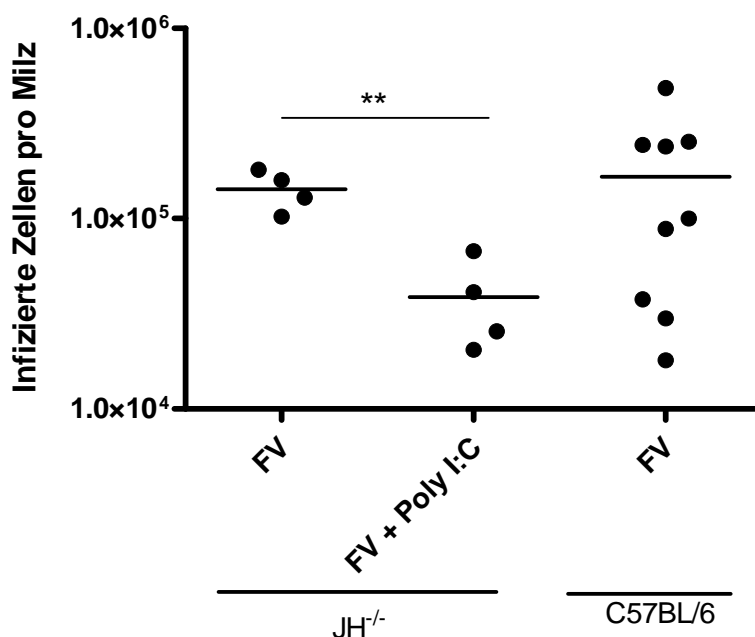


Abbildung 4.12 Poly I:C-Behandlung in der akuten FV-Infektion in B-Zell-defizienten Mäusen

Mäuse ohne funktionelle B-Zellen ($JH^{-/-}$) wurden zweimal mit Poly I:C an den Tagen 4 und 8 nach Infektion mit FV behandelt. 10 Tage nach Infektion wurde die Viruslast in der Milz mittels „*Infectious center assay*“ analysiert. Mindestens 4 Mäuse pro Gruppe wurden in der akuten Infektion auf ihre Viruslast in der Milz untersucht und die Mittelwerte für jede Gruppe sind durch einen Querbalken dargestellt. Die Unterschiede zwischen den Poly I:C-behandelten Mäusen und den Kontrollen wurden mit Hilfe des „*student t Test*“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt durch * < 0,05; ** < 0,005; *** < 0,0005.

Wie in Abbildung 4.12 gezeigt, spielen B-Zellen keine wichtige Rolle für die Therapie mit Poly I:C. Die behandelten Tiere hatten im Vergleich zu den unbehandelten

Kontrollmäusen eine 3,5-fache Reduktion der Viruslast in der Milz ($1,4 \times 10^5$ infizierte Zellen in der Milz unbehandelter Tiere zu $0,4 \times 10^5$ infizierte Zellen in der Milz Poly I:C-behandelter Mäuse). Die Viruslast der unbehandelten Knockout-Kontrolltiere war ähnlich, wie die von resistenten Wildtyp-Tieren (im Durchschnitt $1,6 \times 10^5$ infizierte Zellen in der Milz resistenter C57BL/6-Mäuse). Das bedeutet, dass resistente Mäuse auch ohne B-Zellen eine akute FV-Infektion kontrollieren können, und dass B-Zellen für eine erfolgreiche Therapie mit Poly I:C nicht benötigt werden.

4.6.2 Poly I:C-Behandlung in der akuten FV-Infektion erhöht die Anzahl an aktivierten NK-Zellen

Frühere Arbeiten beschrieben bereits die Rolle von NK-Zellen in der FV-Infektion (94, 203). Diese Ergebnisse sind jedoch sehr widersprüchlich, so dass die eigentliche Rolle von NK-Zellen während einer FV-Infektion ungeklärt ist. Daher sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob die therapeutische Gabe von Poly I:C in der akuten FV-Infektion einen Einfluss auf die NK-Zellantwort hat. Dazu wurden wie in Abbildung 4.2 schematisch dargestellt Mäuse mit FV infiziert und an Tag 4 und 8 nach Infektion mit Poly I:C behandelt. An Tag 10 nach Infektion wurden die Tiere auf die Aktivierung und Effektorfunktion ihrer NK-Zellen in der Milz hin untersucht. In Abbildung 4.13 sind die Ergebnisse der Analyse dargestellt.

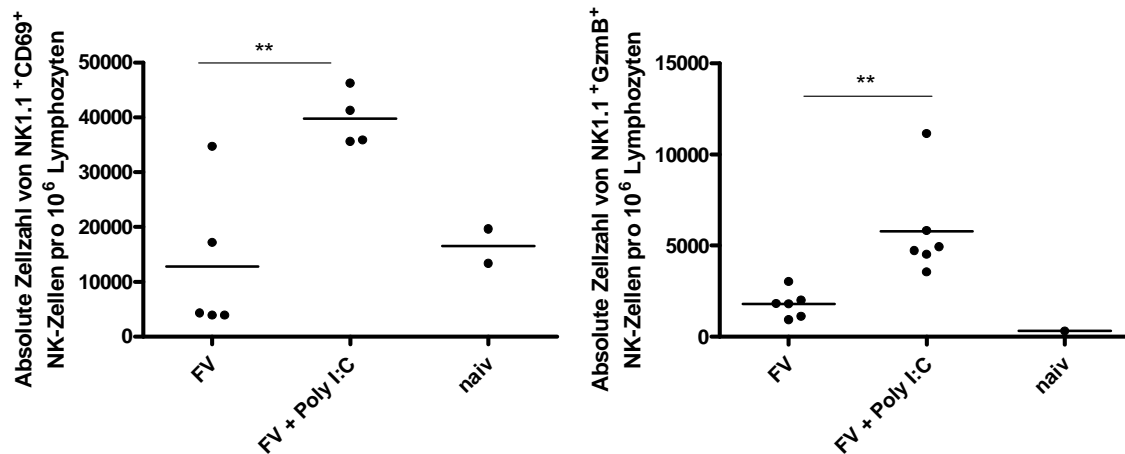


Abbildung 4.13 Untersuchung der Aktivierung von NK-Zellen nach Poly I:C-Behandlung

Suszeptible Mäuse wurden zweimal mit Poly I:C an den Tagen 4 und 8 nach FV-Infektion behandelt. 10 Tage nach FV-Infektion wurden lebendige Milzzellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Oberflächenexpression des Aktivierungsmarkers CD69 von NK1.1⁺ NK-Zellen und die intrazelluläre Expression von Granzym B in NK1.1⁺ NK-Zellen wurden untersucht. Die absolute Anzahl von aktivierten und GzmB⁺ NK-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten ist dargestellt. Mindestens 4 Mäuse pro Gruppe wurden untersucht und die Mittelwerte für jede Gruppe sind durch einen Querbalken dargestellt. Die Unterschiede zwischen den Poly I:C-behandelten Mäusen und den Kontrollen wurden mit Hilfe des „*student t Test*“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt durch * < 0,05; ** < 0,005; *** < 0,0005.

Die zweifache Injektion von Poly I:C während der FV-Infektion führte zu einer signifikanten Erhöhung der Anzahl aktivierter (CD69⁺) NK-Zellen (durchschnittlich 40.000 CD69⁺ NK1.1⁺ Zellen in den behandelten und 13.000 CD69⁺ NK1.1⁺ Zellen pro 10⁶ Lymphozyten in den unbehandelten Kontrolltieren). Es wurde zusätzlich noch die Funktion von NK-Zellen mittels Granzym B-Expression (GzmB) untersucht. Es zeigte sich, dass die Behandlung mit Poly I:C im Vergleich zu den unbehandelten infizierten Kontrollen (durchschnittlich 1800 GzmB⁺ NK1.1⁺ Zellen pro 10⁶ Lymphozyten) zu einer verstärkten GzmB-Expression in NK-Zellen führte (durchschnittlich 6000 GzmB⁺ NK1.1⁺ Zellen pro 10⁶ Lymphozyten). Eine Therapie mit Poly I:C resultierte also in einer Aktivierung von NK-Zellen und in einer verstärkten GzmB-Produktion. Des Weiteren sollte die Rolle von NK-Zellen für die Poly I:C-Therapie in der akuten FV-Infektion weiter charakterisiert werden.

4.6.3 Depletionsexperimente deuten auf eine wichtige Rolle von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen während der Behandlung mit Poly I:C hin

Um die Bedeutung verschiedener Lymphozyten in der Behandlung mit Poly I:C genauer zu untersuchen, wurden diese während der Behandlung mittels zellspezifischer Antikörper wie in Abbildung 4.14 gezeigt, depletiert.

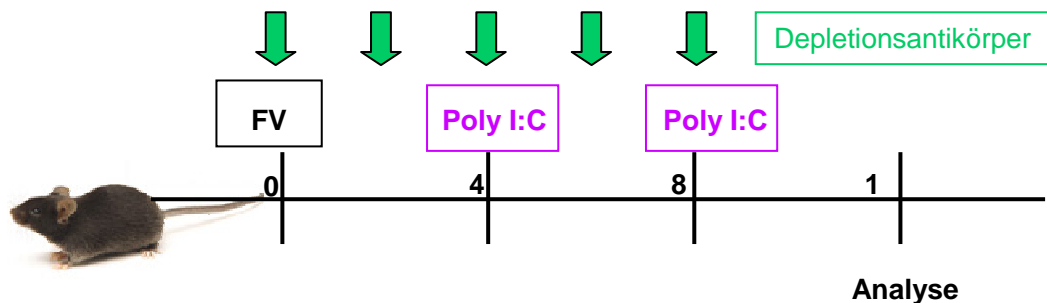


Abbildung 4.14 Versuchsablauf der Lymphozytendepletion während der Poly I:C-Behandlung

Suszeptible Mäuse wurden zweimal an den Tagen 4 und 8 nach FV-Infektion mit Poly I:C behandelt. Zelldepletionen wurden durch fünf i.p. Injektionen der zellspezifischen monoklonalen Antikörper gegen CD4, CD8 oder NK1.1 beginnend am Tag der FV-Infektion durchgeführt. 10 Tage nach Infektion wurden die Milzgewichte und die Viruslast in der Milz analysiert.

Es wurde jeweils die Bedeutung von NK, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen auf die Behandlung mit Poly I:C untersucht. Dazu wurden 10 Tage nach Infektion die Viruslast und das Milzgewicht in depletierten Mäusen bestimmt.

In Abbildung 4.15 A ist zu sehen, dass die Mäuse, deren NK-Zellen depletiert wurden, ähnliche Milzgewichte nach der Poly I:C-Therapie aufwiesen wie undepletierte, behandelte Tiere (im Mittel 0,42 g nach NK-Zell-Depletion und 0,32 g ohne Depletion). Im Gegensatz dazu führte eine Depletion von T-Zellen zu einer schweren Splenomegalie. Die Poly I:C-behandelten Mäuse ohne CD4⁺ T-Zellen hatten ein durchschnittliches Milzgewicht von 1,8 g, und die Depletion von CD8⁺ T-Zellen führte während der Poly I:C-Therapie zu einem mittleren Milzgewicht von 2,4 g. Die Milzgewichte dieser Gruppen waren vergleichbar mit den Milzgewichten von unbehandelten FV-infizierten Mäusen (im Durchschnitt: 1,8 g). In Abbildung 4.15 B zeigen sich ähnliche Resultate für die Viruslast der untersuchten Tiere. So hatte die Depletion von NK-Zellen keinen signifikanten Einfluss auf die Viruslast, denn diese war vergleichbar mit den undepletierten Tieren (im Mittel: 2×10^5 infizierte Zellen pro Milz in den nicht-depletierten Poly I:C-behandelten Tieren und 9×10^5 infizierte Zellen pro Milz in den NK-Zell-depletierten, Poly I:C-behandelten Mäusen). Die Depletion von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen während der Poly I:C-Behandlung führte zu einem signifikanten Anstieg der Viruslast (durchschnittlich $1,5 \times 10^7$ infizierte Zellen pro Milz

in den CD4-depletierten Poly I:C-behandelten Tieren und 7×10^7 infizierte Zellen pro Milz in den CD8-depletierten, Poly I:C-behandelten Mäusen). Diese Werte waren im Bereich von unbehandelten FV-infizierten Kontrolltieren, deren mittlere Viruslast bei 2×10^7 infizierte Zellen in der Milz lag.

Somit konnte gezeigt werden, dass eine Depletion von NK-Zellen keinen Einfluss auf die Poly I:C-Therapie hatte. Wie in Abbildung 4.13 gezeigt, spielen also die beobachteten Effekte von Poly I:C auf NK-Zellen wie die erhöhte Aktivierung und die gesteigerte Granzym B-Produktion dieser Zellen keine Rolle während der Therapie mit Poly I:C. Denn auch ohne NK-Zellen waren die Mäuse in der Lage, die Virusreplikation nach Poly I:C-Injektion zu kontrollieren. Die CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen spielen dagegen offensichtlich eine wichtige Rolle während der Poly I:C-Therapie. Wurden diese Zellen während der Behandlung depletiert, so kam es trotz endogener IFN α -Induktion zu einer schweren Splenomegalie und zu einer hohen Anzahl virus-infizierter Zellen in der Milz. Die Therapie mit Poly I:C hatte nur in Anwesenheit von T-Zellen Erfolg.

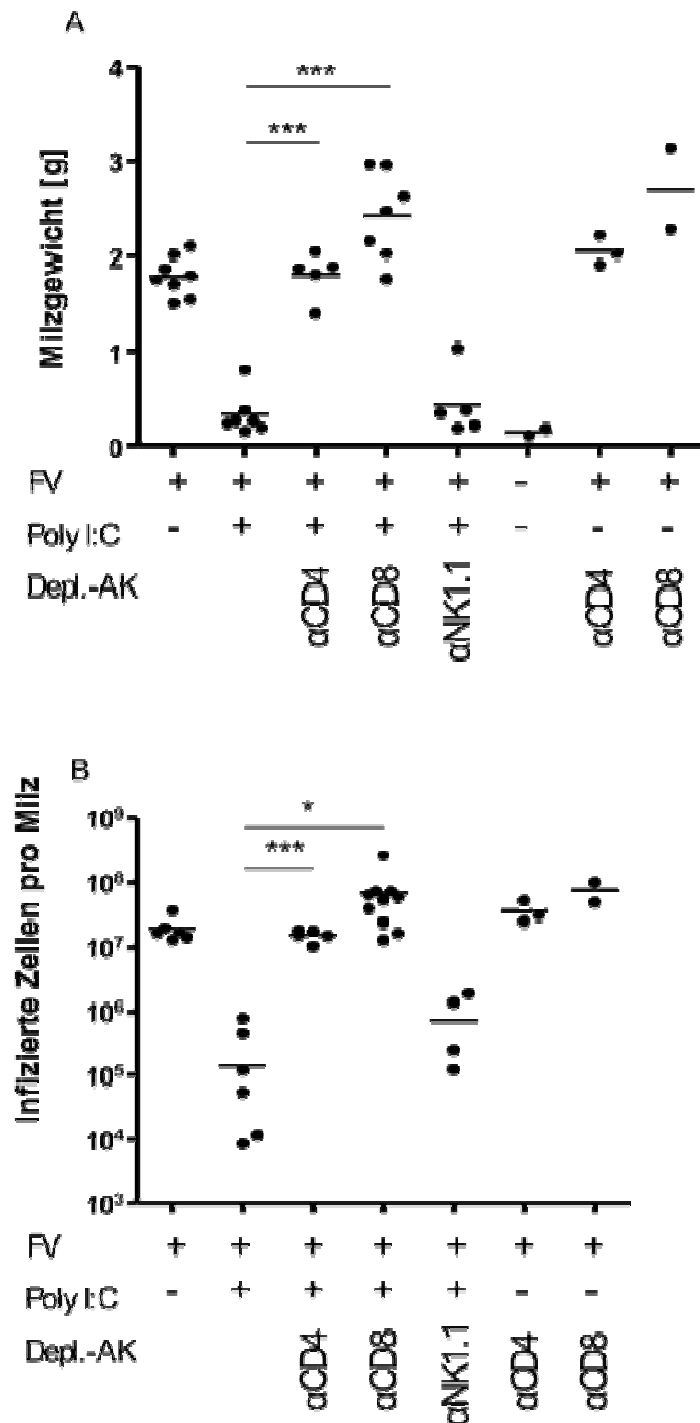


Abbildung 4.15 Depletion von Lymphozyten während Poly I:C-Therapie in der akuten FV-Infektion

Suszeptible Mäuse wurden zweimal an den Tagen 4 und 8 nach FV-Infektion mit Poly I:C behandelt. Zelldepletionen wurden durch fünf i.p. Injektionen beginnend am Tag der Infektion durchgeführt. CD8⁺ T-Zellen wurden mittels monoklonalem α169.4 depletiert, CD4⁺ T-Zellen durch den monoklonalen αYTS191.1 und NK-Zellen durch den monoklonalen αPK136. 10 Tage nach Infektion wurden die Milzgewichte (A) und die Viruslast (B) mittels „Infectious center assay“ in der Milz analysiert. Poly I:C-behandelte nicht-depletierte Mäuse und Lymphozyten-depletierte, unbehandelte Mäuse wurden als Kontrollen verwendet. Mindestens 5 Mäuse pro Gruppe behandelter Tiere wurden untersucht und die Mittelwerte für jede Gruppe sind durch einen Querbalken dargestellt. Die Unterschiede zwischen den Poly I:C-behandelten depletierten Mäusen und den Kontrollen wurden mit Hilfe des „student t Test“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt durch * < 0,05; ** < 0,005; *** < 0,0005.

4.6.4 Poly I:C-Therapie induziert die Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen

Wie in Abbildung 4.15 zu sehen ist, spielen CD4⁺ T-Zellen offensichtlich eine zentrale Rolle bei der Poly I:C-Therapie gegen FV. Daher sollten diese Zellen genauer analysiert werden. Dazu wurden Mäuse wie in Abbildung 4.2 schematisch dargestellt in der akuten FV-Infektion an Tag 4 und 8 nach Infektion mit Poly I:C behandelt und an Tag 10 wurden die CD4⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Zunächst wurde die Anzahl von FV-spezifischen CD4⁺ Effektorzellen mit Hilfe von MHC-II-Tetrameren untersucht, um herauszufinden, ob diese Zellpopulation während der Therapie mit Poly I:C expandierte. Diese Tetramere präsentieren ein FV-spezifisches CD4⁺ T-Zell-Epitop (F-MuLV env CD4⁺ Epitop env122-141), wodurch die Tetramere nur an FV-spezifische CD4⁺ T-Zellen binden. Es wurden wie in Abbildung 4.16 gezeigt keine Unterschiede in der absoluten Anzahl von virus-spezifischen CD4⁺ T-Zellen zwischen behandelten und unbehandelten Tiere gefunden (im Mittel: 1745 FV-spezifische CD4⁺ T-Zellen in unbehandelten und 2000 in behandelten Mäusen).

4.6.4.1 Die Poly I:C-Behandlung führt zu keiner Expansion von FV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen

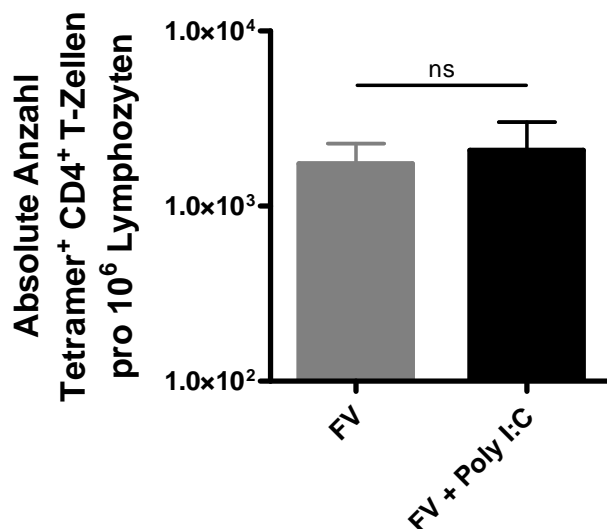


Abbildung 4.16 Untersuchung von FV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen nach Poly I:C-Behandlung

Suszeptible Mäuse wurden zweimal mit Poly I:C an den Tagen 4 und 8 nach FV-Infektion behandelt. 10 Tage nach FV-Infektion wurden lebendige Milzzellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Anzahl virus-spezifischer CD4⁺ T-Zellen wurde mittels Tetramer-Färbung untersucht. Die Mittelwerte (+SEM) der absoluten Anzahl von Tetramer⁺ CD4⁺ T-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten ist dargestellt. Mindestens 4 Mäuse pro Gruppe wurden untersucht. Die Unterschiede zwischen den Poly I:C-behandelten Mäusen und den Kontrollen wurden mit Hilfe des „*student t Test*“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt durch * < 0,05; ** < 0,005; *** < 0,0005.

Durch die geringe Anzahl an messbaren FV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen ist es nicht möglich diese näher zu charakterisieren. Um die Effektorfunktion dieser Zellen zu untersuchen, müssen die Zellen *ex vivo* mit α CD3/ α CD28 stimuliert werden, um intrazellulär eine messbare Zytokinantwort zu erhalten. Jedoch kommt es durch eine Stimulation von CD4⁺ T-Zellen mit α CD3 zu einer Internalisierung des TCR-Komplexes (24, 136, 186), so dass eine Färbung mit MHC-II-Tetrameren nicht mehr durchführbar ist. Daher wurde im Weiteren die Effektorfunktion von allen aktivierten CD4⁺ T-Zellen untersucht, und nicht ausschließlich die von virus-spezifischen CD4⁺ T-Zellen.

4.6.4.2 Verbesserte Funktion der Effektor-CD4⁺ T-Zellen nach Poly I:C-Behandlung

Um die CD4⁺ T-Zellantwort genauer zu analysieren, wurde zunächst der Aktivitätsstatus der CD4⁺ T-Zellen nach Poly I:C-Gabe durchflusszytometrisch untersucht. In Abbildung 4.17 ist gezeigt, dass die zweifache Injektion von Poly I:C im Vergleich zu den unbehandelten FV-infizierten Mäusen zu einer signifikanten Zunahme der aktivierten (CD43⁺ oder CD69⁺) CD4⁺ T-Zellen führte.

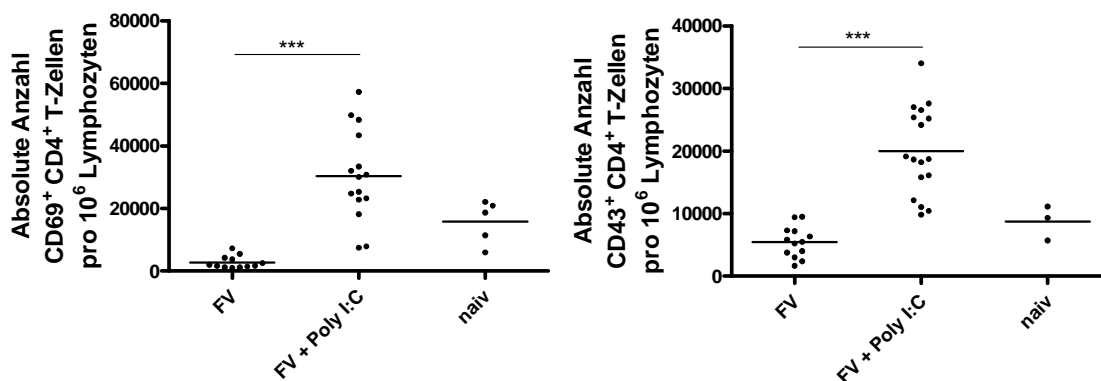


Abbildung 4.17 Untersuchung der Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen nach Poly I:C-Behandlung

Suszeptible Mäuse wurden zweimal mit Poly I:C an den Tagen 4 und 8 nach FV-Infektion behandelt. 10 Tage nach FV-Infektion wurden lebendige Milzzellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Oberflächenexpression der Aktivierungsmarker CD69 und CD43 auf CD4⁺ T-Zellen wurde untersucht. Die absolute Anzahl von aktivierten CD4⁺ T-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten ist dargestellt. Mindestens 12 Mäuse pro FV-infizierter Gruppe wurden untersucht und die Mittelwerte für jede Gruppe sind durch einen Querbalken dargestellt. Die Unterschiede zwischen den Poly I:C-behandelten Mäusen und den Kontrollen wurden mit Hilfe des „student t Test“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt durch * < 0,05; ** < 0,005; *** < 0,0005.

Im Falle des frühen Aktivierungsmarkers CD69, war eine fast 10-fache Zunahme an aktivierten CD4⁺ T-Zellen nach Poly I:C-Behandlung zu messen (im Durchschnitt 2800 CD69⁺ CD4⁺ T-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten in unbehandelten und 30.000 CD69⁺ CD4⁺ T-Zellen in behandelten Tieren). Auch die Untersuchung des Effektorzellmarkers CD43 zeigte eine 4-fach erhöhte Anzahl an Effektor-CD4⁺ T-Zellen nach Poly I:C-Behandlung verglichen mit FV-infizierten Kontrollen (im Mittel 20.000 CD43⁺ CD4⁺ T-Zellen in behandelten Tieren und 5000 CD43⁺ CD4⁺ T-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten in unbehandelten).

Eine der wichtigsten Aufgaben von CD4⁺ T-Zellen ist die Produktion und Sekretion von Zytokinen. Deshalb wurde in weiteren durchflusszytometrischen Untersuchungen die Fähigkeit dieser aktivierten CD4⁺ T-Zellen, Zytokine wie TNF α , IL-2 und IFN γ zu produzieren, untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.18 gezeigt.

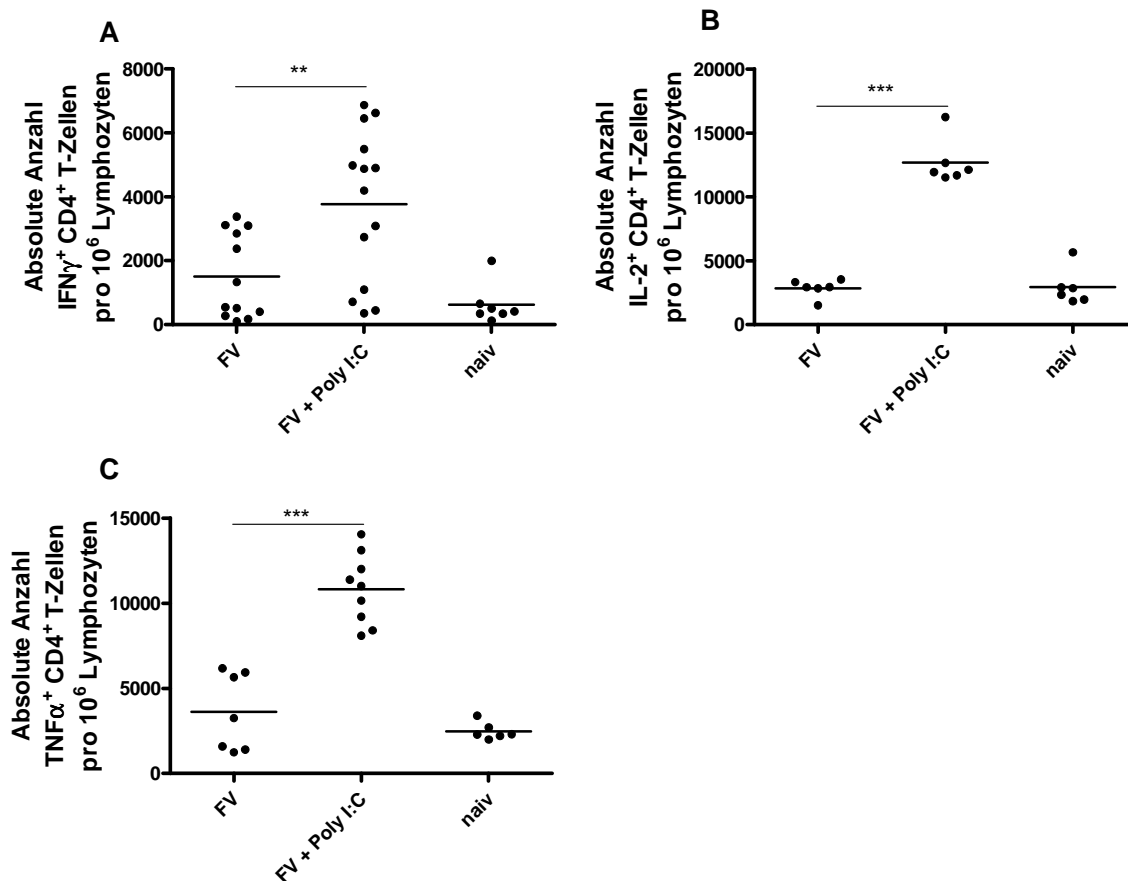


Abbildung 4.18 Untersuchung von Effektor-CD4⁺ T-Zellen nach Poly I:C-Behandlung

Suszeptible Mäuse wurden zweimal mit Poly I:C an den Tagen 4 und 8 nach FV-Infektion behandelt. 10 Tage nach FV-Infektion wurden Milzzellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die intrazelluläre Expression der Zytokine IFN γ (A), IL-2 (B) und TNF α (C) von CD4⁺ T-Zellen wurde untersucht. Die absolute Anzahl von Zytokin-produzierenden CD4⁺ T-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten ist dargestellt. Mindestens 6 Mäuse pro FV-infizierter Gruppe wurden untersucht und die Mittelwerte für jede Gruppe sind durch Querbalken dargestellt. Die Unterschiede zwischen den Poly I:C-behandelten Mäusen und den Kontrollen wurden mit Hilfe des „*student t Test*“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt durch * < 0,05; ** < 0,005; *** < 0,0005.

Wie in A dargestellt, war eine Zunahme an IFN γ -produzierenden CD4⁺ T-Zellen nach Poly I:C-Gabe zu beobachten (im Mittel 1500 IFN γ ⁺ CD4⁺ T-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten in behandelten Tieren zu 3800 in unbehandelten). Es war auch eine Zunahme an IL-2-produzierenden (B) und TNF α -produzierenden CD4⁺ T-Zellen (C) festzustellen, wobei eine 5 bis 6-fach erhöhte Anzahl an Zytokin-produzierenden CD4⁺ T-Zellen gemessen wurde (im Durchschnitt 2800 IL-2⁺ CD4⁺ T-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten bei unbehandelten zu 12700 bei behandelten Mäusen bzw. 6000 TNF α ⁺ CD4⁺ T-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten bei unbehandelten zu 36.000 bei Poly I:C-behandelten Mäusen).

Eine Behandlung mit Poly I:C führte also zur Aktivierung von T-Helferzellen und zur gleichzeitig gesteigerten Effektorfunktion dieser Zellen.

Es ist beschrieben, dass multifunktionelle T-Zellen, also solche, welche mehrere Zytokine (IL-2, TNF α , IFN γ) gleichzeitig produzieren, einen erhöhten Schutz gegen verschiedene Erreger vermitteln, da sie ein breiteres Spektrum an Effektorfunktionen haben (173). Daher wurden die in Abbildung 4.18 untersuchten Zellen hinsichtlich ihrer Multifunktionalität analysiert.

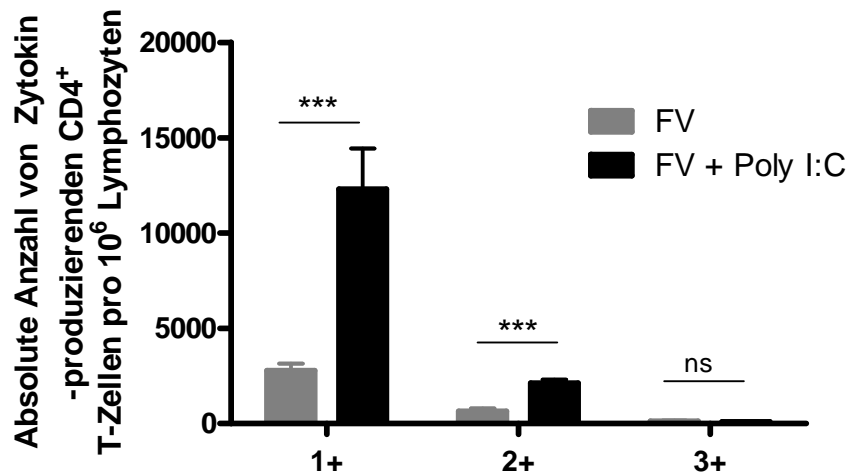


Abbildung 4.19 Untersuchung multifunktionaler CD4⁺ T-Zellen nach Poly I:C-Behandlung

Suszeptible Mäuse wurden zweimal mit Poly I:C an den Tagen 4 und 8 nach FV-Infektion behandelt. 10 Tage nach FV-Infektion wurden lebendige Milzzellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die intrazelluläre Expression der Zytokine IFN γ (A), IL-2 (B) und TNF α (C) von CD4⁺ T-Zellen wurde untersucht. Die absolute Anzahl von Einzel-Zytokin (1+), Doppel-Zytokin (2+) und Dreifach-Zytokin (3+) produzierenden CD4⁺ T-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten ist dargestellt. Mindestens 6 Mäuse pro FV-infizierter Gruppe wurden untersucht und die Mittelwerte (+SEM) sind dargestellt. Die Unterschiede zwischen den Poly I:C-behandelten Mäusen und den Kontrollen wurden mit Hilfe des „student t Test“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt durch * < 0,05; ** < 0,005; *** < 0,0005.

Wie in Abbildung 4.20 gezeigt, kam es nach Poly I:C-Gabe zu einer 4-fach erhöhten Anzahl an CD4⁺ T-Zellen, die ein einzelnes Zytokin (IFN γ ⁺, TNF α ⁺ oder IL-2⁺) produzierten, verglichen mit den unbehandelten Mäusen. Die Anzahl an Doppel-Zytokinproduzenten (IFN γ ⁺TNF α ⁺, IFN γ ⁺IL-2⁺ oder IL-2⁺TNF α ⁺) stieg nach Poly I:C-Therapie signifikant um das dreifache von durchschnittlich 600 auf 2200 CD4⁺ T-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten. Die Therapie mit Poly I:C führte allerdings zu keiner Veränderung der Anzahl von Dreifach-Zytokinproduzenten in der Population der aktivierten CD4⁺ T-Zellen.

Die Ergebnisse der CD4⁺ T-Zelldepletion (siehe Abbildung 4.15) ließen vermuten, dass CD4⁺ T-Zellen eine zentrale Rolle in der erfolgreichen Behandlung der FV-Infektion mit Poly I:C spielen. Diese Ergebnisse konnten hier bestätigt werden, denn

es zeigte sich, dass Poly I:C zu einer Zunahme der Anzahl aktivierter $CD4^+$ T-Zellen und zu einer verbesserten Effektorfunktion dieser Zellen führte.

4.6.5 Poly I:C-Therapie induziert die Aktivierung von $CD8^+$ T-Zellen

4.6.5.1 Die Poly I:C-Behandlung führt zu keiner Expansion von FV-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen

Die Depletionsexperimente (siehe Abbildung 4.15) deuteten die wichtige Rolle von $CD8^+$ T-Zellen für die antivirale Wirkung von Poly I:C an. Deshalb wurde weiterhin untersucht, ob es während der Therapie zu einer erhöhten Anzahl an FV-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen kommt. Dies erfolgte mittels MHC-I-Tetramer-Färbung. Diese präsentieren ein FV GagL Peptid und erkennen somit FV-spezifische $CD8^+$ T-Zellen. Die Analyse erfolgte durchflusszytometrisch, wodurch auch weitere Merkmale dieser Zellen gleichzeitig untersucht werden konnten.

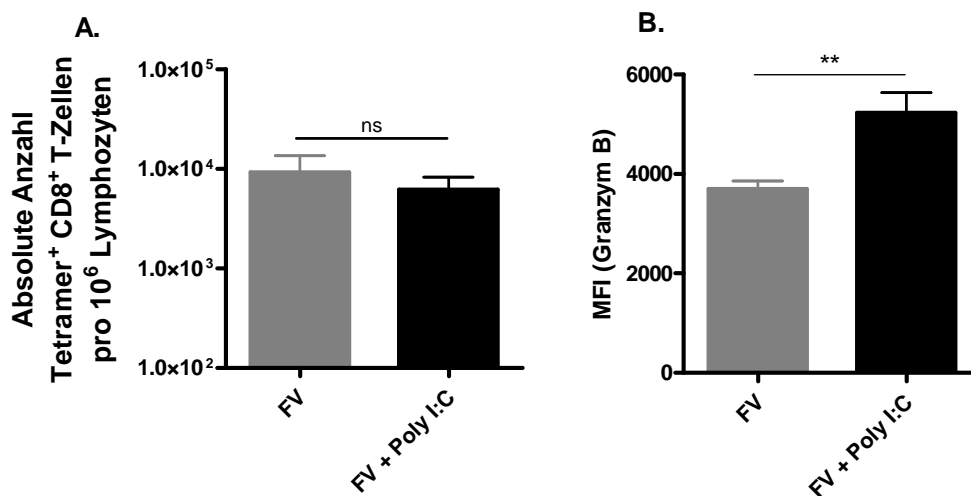


Abbildung 4.20 Untersuchung von FV-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen nach Poly I:C-Behandlung

Suszeptible Mäuse wurden zweimal mit Poly I:C an den Tagen 4 und 8 nach FV-Infektion behandelt. 10 Tage nach FV-Infektion wurden lebendige Milzzellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Anzahl virus-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen wurde mittels Tetramer-Färbung und die Fähigkeit dieser Zellen Granzym B zu produzieren mittels intrazellulärer Färbung untersucht. Die Mittelwerte (+SEM) der absoluten Anzahl von Tetramer⁺ $CD8^+$ T-Zellen pro 10^6 Lymphozyten und die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von Granzym B ist dargestellt. Mindestens 4 Mäuse pro Gruppe wurden untersucht. Die Unterschiede zwischen den Poly I:C-behandelten Mäusen und den Kontrollen wurden mit Hilfe des „student t Test“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt durch * $< 0,05$; ** $< 0,005$; *** $< 0,0005$.

In Abbildung 4.20 ist gezeigt, dass durch Poly I:C-Gabe die Anzahl FV-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen nicht signifikant verändert wurde. Jedoch ist anhand der mittleren

Fluoreszenzintensität (MFI) nach Färbung von Granzym B zu erkennen, dass diese virus-spezifischen CD8⁺ T-Zellen mehr Granzym B produzierten (MFI: 5200), als die unbehandelten Kontrollen (MFI: 3700). Poly I:C führte nicht zu einer Expansion der FV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen, jedoch kam es zu einer verbesserten Effektorfunktion dieser Zellen.

Wie bereits in 4.6.4 beschrieben, können auch im Falle von MHC-I-Tetrameren neben der Produktion von Granzym B keine weiteren Zytokinen in CD8⁺ T-Zellen intrazellulär analysiert werden, da die notwendige *ex vivo* Stimulation zur T-Zellrezeptorinternalisierung führt. Daher wurden weitere Effektorfunktionen von CD8⁺ T-Zellen an aktivierten CD43⁺ CD8⁺ T-Zellen genauer untersucht.

4.6.5.2 Verbesserte Funktion der Effektor-CD8⁺ T-Zellen nach Poly I:C-Behandlung

Zur Analyse aller Effektor-CD8⁺ T-Zellen wurden solche CD8⁺ T-Zellen untersucht, die CD43 auf ihrer Oberfläche exprimieren. Die glykolisierte Form von CD43 (Sialophorin) wird nach Aktivierung auf der Oberfläche von Lymphozyten exprimiert und dient daher als Marker für Effektorzellen. In Abbildung 4.21A ist zu erkennen, dass die Behandlung mit Poly I:C während der akuten FV-Infektion in einer erhöhten Anzahl an Effektor-CD8⁺ T-Zellen resultierte (im Durchschnitt 21000 CD43⁺ CD8⁺ T-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten in Poly I:C-behandelten Mäusen und 3400 CD43⁺ CD8⁺ T-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten in unbehandelten Kontrolltieren). Weiterhin war zu beobachten, dass die Poly I:C-Therapie zu einer erhöhten Zytotoxizität der CD8⁺ T-Zellen führte (C). So kam es nach Poly I:C-Gabe neben einer Zunahme der Granzym B-produzierenden CD8⁺ T-Zellen (durchschnittlich 5000 GzmB⁺ CD8⁺ T-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten in unbehandelten zu 10000 in behandelten Mäusen) auch zu einer erhöhten Anzahl an Effektorzellen, welche antiviral wirken, indem sie zytotoxische Moleküle wie z.B. Granzym B degranulieren. Durch die Verschmelzung der zytotoxischen Granula mit der Zellmembran wird CD107a auf der Oberfläche exprimiert, und dient somit als Indikator für die Degranulation. Nach Poly I:C-Therapie in der akuten FV-Infektion degranulierten im Mittel 10 Mal mehr CD8⁺ T-Zellen als in den unbehandelten Kontrollmäusen (D). Es war darüber hinaus zu beobachten, dass durch Poly I:C-Injektion mehr TNFα-produzierende CD8⁺ T-Zellen in der Milz zu finden waren (B: durchschnittlich 4000 TNFα⁺ CD8⁺ T-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten in unbehandelten zu 22.000 in behandelten Mäusen).

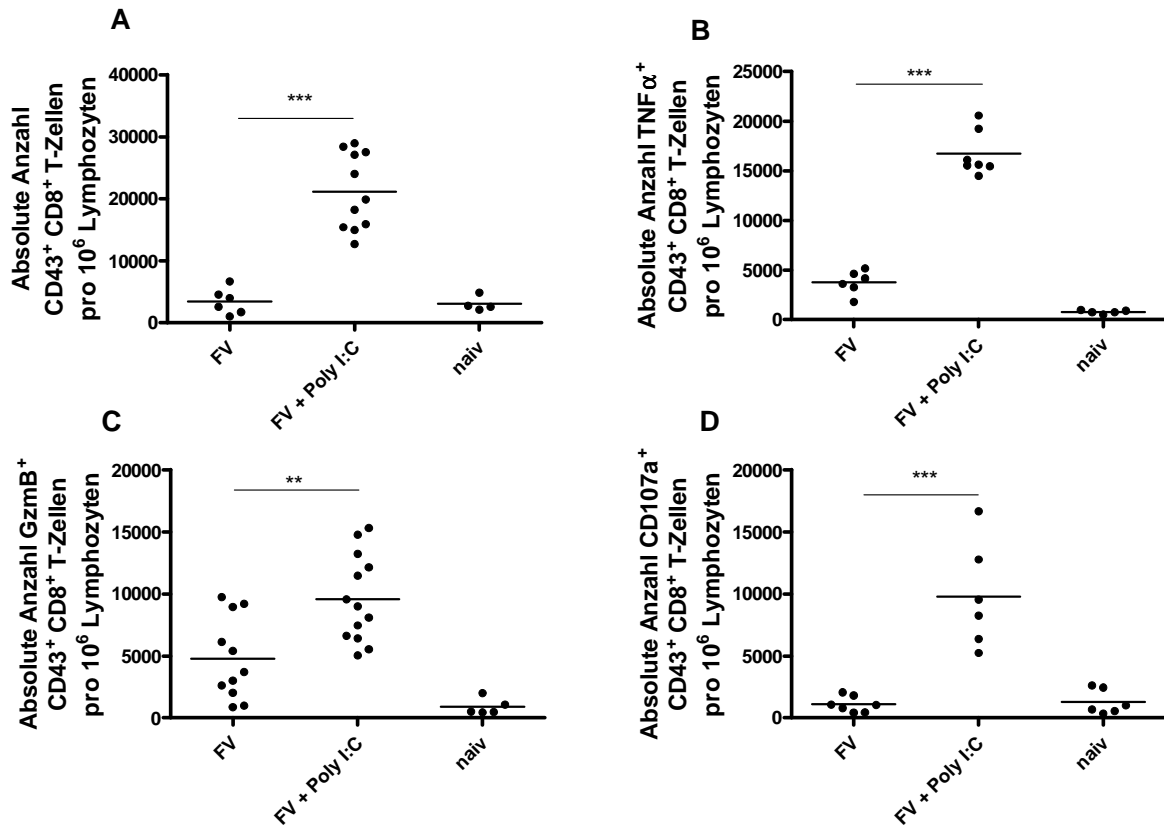


Abbildung 4.21 Untersuchung von Effektor-CD8⁺ T-Zellen nach Poly I:C-Behandlung

Suszeptible Mäuse wurden zweimal mit Poly I:C an den Tagen 4 und 8 nach FV-Infektion behandelt. 10 Tage nach FV-Infektion wurden Milzzellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Oberflächenexpression des Effektorzellmarkers CD43 (A) des Degranulationsmarkers CD107a (D) und die intrazelluläre Expression von Granzym B (C) und TNFα (B) von CD8⁺ T-Zellen wurden untersucht. Die absolute Anzahl von CD43⁺ bzw. Granzym B⁺ bzw. CD107a⁺ bzw. TNFα⁺ CD8⁺ T-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten ist dargestellt. Mindestens 6 Mäuse pro FV-infizierter Gruppe wurden untersucht und die Mittelwerte für jede Gruppe sind durch einen Querbalken dargestellt. Die Unterschiede zwischen den Poly I:C-behandelten Mäusen und den Kontrollen wurden mit Hilfe des „student t Test“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt durch * < 0,05; ** < 0,005; *** < 0,0005.

4.6.5.3 Verbesserte Funktion der Effektor-CD8⁺ T-Zellen nach Poly I:C-Behandlung *in vivo*

Wie in 4.6.5.2 bereits anhand von Färbungen von Markermolekülen gezeigt, führt Poly I:C zu einer gesteigerten Zytotoxizität von CD8⁺ T-Zellen. Um dies direkt *in vivo* nachzuweisen, ist ein *in vivo* CTL Assay (siehe 3.2) durchgeführt worden. Dazu wurden Lymphozyten von naiven Mäusen, welche ein FV-spezifisches CTL-Epitop (AbuAbuLABuLTVFL) auf dem MHC-I präsentieren, in eine Poly I:C-behandelte FV-infizierte Maus gegeben. Die FV-spezifischen zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen erkennen

das Peptid und eliminieren diese Zielzellen. Um eine Zerstörung der Peptid-beladenen Lymphozytenpopulation zu quantifizieren, musste zusätzlich eine Kontrollpopulation ohne Peptid mit in die Maus gegeben werden. Um beide Zellopopulationen später am Durchflusszytometer unterscheiden zu können, wurden diese mit unterschiedlichen Konzentrationen des Farbstoffes CFSE markiert. 2 h nach Injektion der Zellen, wurden Milz und Blut von Poly I:C-behandelten und unbehandelten Mäusen auf ihre FV-spezifische Eliminierung von Zielzellen hin untersucht. In Abbildung 4.22 sind die Ergebnisse dieses Versuches gezeigt.

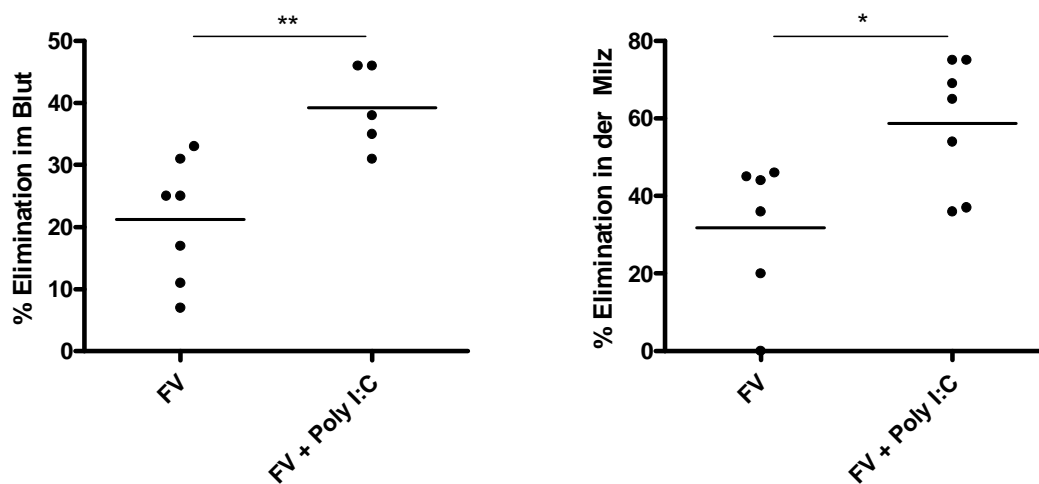


Abbildung 4.22 *In vivo* Zytotoxizität von CD8⁺ T-Zellen

Milzzellen von naiven Mäusen wurden mit dem FV-spezifischen DbGagL-Peptid beladen und mit CFSE markiert. Diese Zellen wurden in naive, FV-infizierte und FV-infizierte Poly I:C-behandelte Mäuse an Tag 8 nach Infektion injiziert (i.v.). Als Kontrolle wurden unbeladene Milzzellen markiert mit einer geringeren Konzentration an CFSE mit in die Mäuse injiziert. Zwei Stunden nach dem Transfer wurden die Donorzellen in Milz und Blut analysiert. Es ist der prozentuale Anteil an Zielzell-spezifischer Elimination in den untersuchten Organen gezeigt. Zwei unabhängige Experimente mit jeweils 3 Mäusen pro Gruppe wurden durchgeführt. Die Unterschiede zwischen den Poly I:C-behandelten Mäusen und den Kontrollen wurden mit Hilfe des „student t Test“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt durch * < 0,05; ** < 0,005; *** < 0,0005.

Eine Behandlung mit Poly I:C in der akuten FV-Infektion führte zu einer verstärkten Eliminierung von Zellen, welche ein virus-spezifisches Epitop auf ihrer Oberfläche präsentierten. Dies bestätigt die vorherigen Ergebnisse, dass die Therapie mit Poly I:C zu einer verbesserten Effektorfunktion der CD8⁺ T-Zellen führte (siehe Abbildung 4.20 und Abbildung 4.21). Im Blut von therapierten Tieren kam es zu einer fast doppelt so starken Eliminierung von Zielzellen (39%) wie in den unbehandelten Kontrollen (21%). Besonders stark war das zielzell-spezifische Töten in der Milz. Dort führte die erhöhte Zytotoxizität der CD8⁺ T-Zellen nach Poly I:C-Gabe zu einer

59%igen Eliminierung der Zielzellen. Dies war ein signifikanter Anstieg im Vergleich zu den unbehandelten Tieren, welche 32% der Zielzellen eliminierten.

Die Behandlung mit Poly I:C resultierte wie schon für CD4⁺ T-Zellen gezeigt nicht in einer Expansion von FV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen (siehe Abbildung 4.20), aber in einer verbesserten Effektorfunktion der virus-spezifischen CD8⁺ T-Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass durch die unspezifische T-Zellaktivierung durch Poly I:C eine verbesserte virus-spezifische Immunantwort induziert wurde.

4.6.6 Die Granzym B-Produktion alleine spielt eine untergeordnete Rolle für die Poly I:C-Therapie

Es wurde in den vorherigen Abschnitten für CD8⁺ T-Zellen gezeigt, dass eine gesteigerte Zytotoxizität dieser Zellen durch die Injektion von Poly I:C erreicht wurde. Nun stellte sich daraus die Frage, ob die beobachteten Effekte allein durch die gesteigerte Produktion von Granzym B erzielt wurden, wie sie in Abbildung 4.20 und Abbildung 4.21 gezeigt ist. Dazu wurde die Behandlung wie in Abbildung 4.2 schematisch dargestellt in Mäusen durchgeführt, welche kein Granzym B produzieren können (GzmB^{-/-}). Die Ergebnisse sind in folgender Abbildung dargestellt.

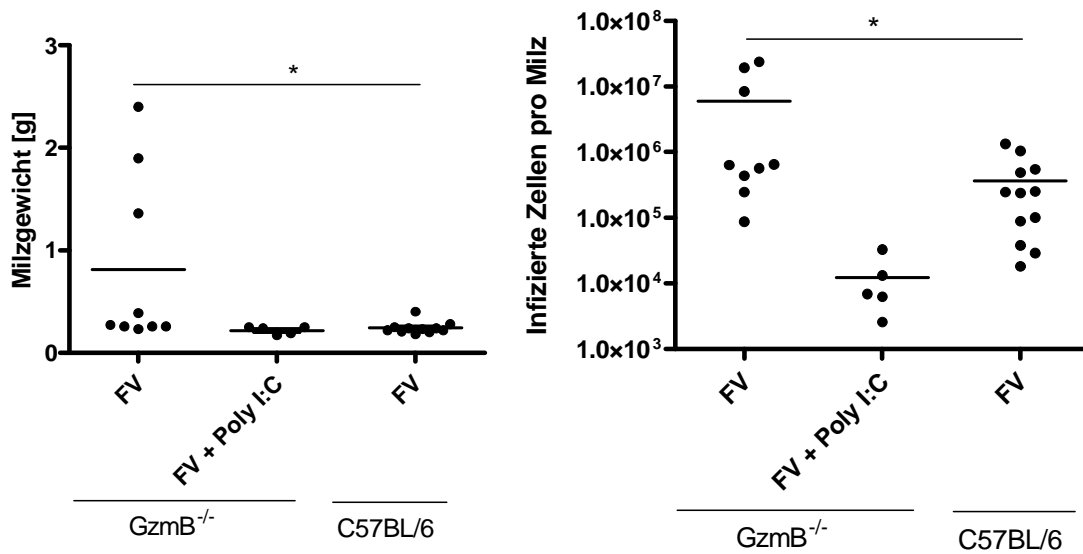


Abbildung 4.23 Poly I:C-Therapie in der akuten FV-Infektion in GzmB^{-/-} Mäusen

Mäuse mit einer konventionellen Genausschaltung von GzmB (GzmB^{-/-}) wurden zweimal mit Poly I:C an den Tagen 4 und 8 nach Infektion mit FV behandelt. 10 Tage nach Infektion wurde die Viruslast in der Milz mittels „Infectious center assay“ analysiert. Mindestens 5 Mäuse pro Gruppe wurden in der akuten Infektion auf ihre Viruslast in der Milz untersucht und die Mittelwerte für jede Gruppe sind durch einen Querbalken dargestellt. Die Unterschiede zwischen den Poly I:C-behandelten Mäusen und den Kontrollen wurden mit Hilfe des „student t Test“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt durch * < 0,05; ** < 0,005; *** < 0,0005.

Die unbehandelten Knockout-Tiere zeigten in der akuten FV-Infektion eine Splenomegalie (mittleres Milzgewicht: 0,8 g) und eine hohe Viruslast in der Milz (durchschnittlich 6×10^6 infizierte Zellen pro Milz). Die Viruslast und das Milzgewicht in den unbehandelten Knockout-Mäusen war im Vergleich zu unbehandelten Wildtyp-Mäusen signifikant erhöht (C57BL/6: im Durchschnitt 3×10^5 infizierte Zellen pro Milz und ein mittleres Milzgewicht von 0,24 g). Eine Behandlung mit Poly I:C in den Knockout-Mäusen verhinderte die Entstehung einer Splenomegalie (durchschnittliches Milzgewicht: 0,22 g) und die Therapie führte zu einer starken Reduktion der Viruslast in der Milz (1×10^4 infizierte Zellen pro Milz). Somit konnte gezeigt werden, dass das alleinige Fehlen von GzmB den Erfolg der Therapie mit Poly I:C nicht beeinflusst. Das Ergebnis korreliert mit einer früheren Arbeit, in der gezeigt wurde, dass das gleichzeitige Fehlen der drei zytotoxischen Moleküle Perforin, Granzym A und B, resistente Mäuse susceptible für die FV-induzierte Splenomegalie machte. Allerdings waren Knockout-Mäuse, in denen eins dieser Moleküle funktionell war, in der Lage die Virusreplikation zu supprimieren und die Entstehung einer FV-induzierten Leukämie zu verhindern (202).

4.7 Poly I:C induziert neben IFN α auch diverse Chemokine in der Milz

Durch das Binden von Poly I:C an seine Rezeptoren werden neben IFN α viele verschiedene andere Zytokine wie IL-12p70, inflammatorische Zytokine wie IL-1 β , IL-6 und TNF α und diverse Chemokine wie RANTES oder MIP-1 β induziert (168). All diese Zytokine und Chemokine spielen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung und Rekrutierung von T-Zellen.

Daher wurde im Folgenden die Expression von verschiedenen Zytokinen (IFN γ , TNF α , IL-12p70, IL-6, IL-10) und Chemokinen (RANTES, IP-10, MCP-1, MCP-3, MIP-1 α , MIP-1 β) in der Milz von FV-infizierten Mäusen 24 h nach Poly I:C-Gabe mittels ELISA gemessen. In der folgenden Abbildung sind von diesen Zytokinen und Chemokinen die gezeigt, die 24 h nach Poly I:C-Injektion in der Milz nachzuweisen waren.

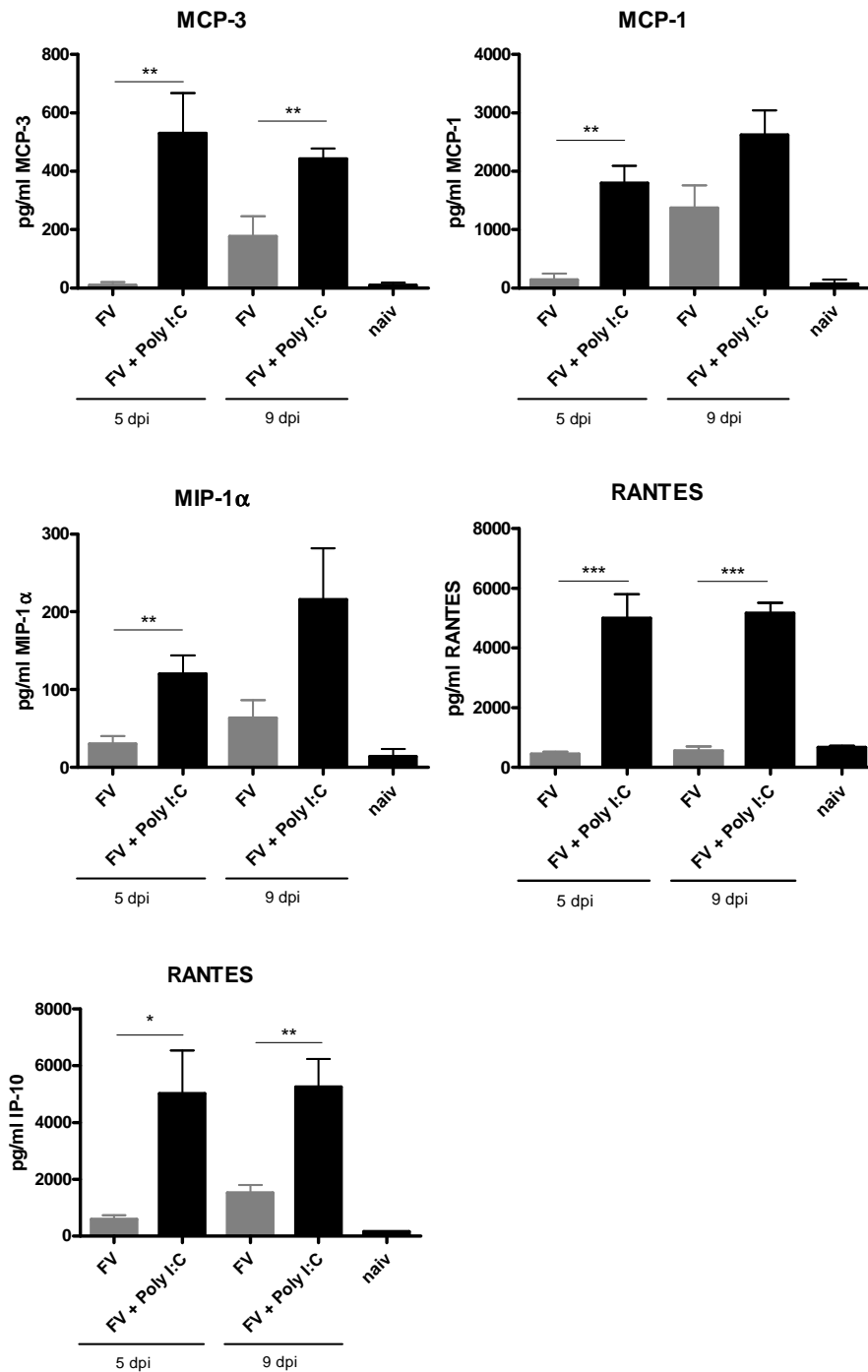


Abbildung 4.24 Expression von Chemokinen in der Milz 24 h nach Poly I:C-Injektion in der akuten FV-Infektion

Suszeptible Y10A-Mäuse wurden mit FV infiziert und an Tag 4 und 8 nach Infektion mit 125 μ g Poly I:C i.p. behandelt. Die Milzen der Mäuse wurde 24 h nach Poly I:C-Injektion entnommen und im Überstand des Milzhomogenats wurde die Konzentration diverser Zytokine und Chemokine mittels ELISA (Flow Cytomix) bestimmt. Die Mittelwerte von 6 Mäusen pro Gruppe mit Standardabweichung (SEM) sind gezeigt. Die Unterschiede zwischen den Poly I:C-behandelten Mäusen und den Kontrollen wurden mit Hilfe des „student t Test“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt durch * < 0,05; ** < 0,005; *** < 0,0005.

Die Ergebnisse zeigen, dass besonders Chemokine, welche Lymphozyten in bestimmte Organe dirigieren, nach Gabe von Poly I:C erhöht sind. So waren die Konzentrationen der Chemokine MCP-1 und MCP-3, welche Monozyten anlocken, und NK-Zellen aktivieren können, nach Gabe von Poly I:C in der Milz stark erhöht. Es war zu erkennen, dass FV-infizierte unbehandelte Tiere nur sehr geringe Konzentrationen dieser Chemoattraktantien im Überstand des Milzhomogenats aufwiesen. Ein signifikanter Anstieg an MIP-1 α -Protein in der Milz von Poly I:C-behandelten Mäusen war zu beobachten. Dieses Protein wird von Makrophagen produziert und hat starke chemotaktische Aktivitäten. Nach der Ausschüttung führt es zu einer lokalen Entzündungsreaktion. Die Expression des Chemokins RANTES (auch: CCL5) wurde ebenfalls sehr stark nach Poly I:C-Gabe induziert. Dieses spielt eine sehr wichtige Rolle in der Rekrutierung von Leukozyten zu Entzündungsstellen. Die Expression wird induziert durch TNF α und neben seiner chemotaktischen Aktivität kann RANTES auch NK- und T-Zellen aktivieren. IP-10 (auch: CXCL10) wurde in großen Mengen durch Poly I:C induziert. Dieses Chemokin wird von Makrophagen und Monozyten nach Aktivierung durch IFN γ produziert, wodurch es einen Marker der T-Zell-Aktivierung darstellt. Die hohe Konzentration an IP-10 deutet darauf hin, dass zuvor schon IFN γ produziert wurde, das 24 h nach Injektion von Poly I:C in der Milz nicht mehr zu messen war.

Durch die Verabreichung von Poly I:C wurde die Expression von diversen Chemokinen in der Milz induziert, so dass es zu einer Rekrutierung von Immunzellen in die Milz, also dem Entzündungsort, kam. Zusätzlich führen die induzierten Chemokine eine Aktivierung der T-Zellen herbei, was mit den zuvor beschriebenen T-Zellaktivierungen nach Poly I:C-Behandlung in der akuten FV-Infektion korreliert (siehe Abbildung 4.17 und Abbildung 4.21A).

4.8 Die therapeutischen Effekte von Poly I:C sind abhängig von MDA5 und TLR3

Poly I:C ist ein synthetisches dsRNA-Polymer, welches in den Endosomen an TLR3 bindet (6) und im Zytosol an MDA5 (69). Obwohl beide Rezeptoren Poly I:C erkennen und binden, ist die resultierende Signalkaskade nach der Bindung unterschiedlich. Im Falle von TLR3 kommt es zur Rekrutierung des Adaptorproteins TRIF, was zur Aktivierung diverser Transkriptionsfaktoren wie IRF3 und NF- κ B führt (200). IRF3 kontrolliert die Expression von IFN α , wohingegen NF- κ B die Expression

von proinflammatorischen Zytokinen induziert. Die im Zytoplasma lokalisierte Helikase MDA5 bindet an das Adaptorprotein IPS-1, welches IRF3 und IRF7 aktiviert (104). Zusätzlich kann IPS-1 mit den Adaptorproteinen FADD (*Fas-associated protein with death domain*) und RIP1 interagieren, so dass es zur Aktivierung des NF- κ B Signalweges kommt (133).

Beide Signalwege können also ähnliche Effekte bei der Aktivierung des Immunsystems haben. Daher stellt sich hier die Frage, ob die beobachteten Effekte von Poly I:C abhängig von der Rezeptorerkennung über TLR3 oder MDA5 waren. Aus diesem Grund wurde die Behandlung mit Poly I:C wie in Abbildung 4.2 schematisch dargestellt mit speziellen Knockout-Mäusen wiederholt. Zum Einen wurden Mäuse verwendet, welche TLR2 und TLR3 konventionell ausgeschaltet haben (TLR2^{-/-}TLR3^{-/-}). TLR2 detektiert bakterielle Bestandteile wie Lipopeptide, Zymosan oder Peptidoglycan (4), und sollte daher keine Rolle in der Erkennung von Poly I:C oder Retroviren spielen. Zum Anderen wurden Knockout-Mäuse verwendet, deren MDA5 konventionell deletiert wurde (MDA5^{-/-}). 10 Tage nach Infektion mit FV und zweifacher Gabe von Poly I:C wurden die Milzen der Tiere auf ihre Viruslast untersucht.

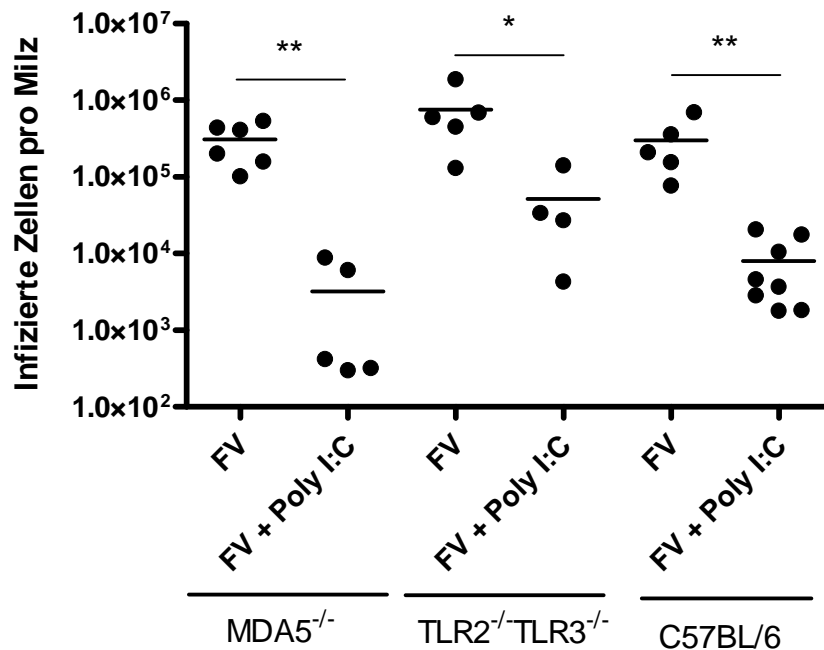


Abbildung 4.25 Poly I:C-Behandlung in der akuten FV-Infektion in TLR2^{-/-}TLR3^{-/-}-Mäusen und MDA5^{-/-}-Mäusen

Mäuse mit einer Deletion des TLR2 und TLR3 (TLR2^{-/-}TLR3^{-/-}) oder des MDA5 (MDA5^{-/-}) wurden zweimal mit Poly I:C an den Tagen 4 und 8 nach Infektion mit FV behandelt. Als Kontrolle dienten Wildtyp-Mäuse (C57BL/6), welche mit FV infiziert wurden. 10 Tage nach Infektion wurde die Viruslast in der Milz mittels „Infectious center assay“ analysiert. Mindestens 4 Mäuse pro Gruppe wurden in der akuten Infektion auf ihre Viruslast in der Milz untersucht und die Mittelwerte für jede Gruppe sind durch einen Querbalken dargestellt. Die Unterschiede zwischen den Poly I:C-behandelten Mäusen und den Kontrollen wurden mit Hilfe des „student t Test“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt durch * < 0,05; ** < 0,005; *** < 0,0005.

In beiden Poly I:C-behandelten Knockout-Mausstämmen wurde eine signifikante Reduktion der Viruslast verglichen mit unbehandelten Kontrollen festgestellt. In MDA5^{-/-}-Mäusen resultierte die Behandlung mit Poly I:C in einer fast 100-fachen Abnahme der Viruslast im Vergleich zu unbehandelten FV-infizierten Knockout-Mäusen (im Durchschnitt $3,1 \times 10^5$ infizierte Zellen in der Milz von unbehandelten Knockout-Tieren und $3,2 \times 10^3$ infizierte Zellen in der Milz von Poly I:C-behandelten MDA5^{-/-}-Mäusen). Dies war ein ähnlich starker antiviraler Effekt wie in Wildtyp-Mäusen (C57BL/6). Die Mäuse, die TLR3 deletiert hatten (TLR2^{-/-}TLR3^{-/-}), zeigten eine Verringerung der Viruslast um das 18-fache nach der Poly I:C-Therapie verglichen mit unbehandelten Knockout-Tieren (durchschnittlich $7,5 \times 10^5$ infizierte Zellen in der Milz von unbehandelten Knockout-Tieren und $4,1 \times 10^4$ infizierte Zellen in der Milz von Poly I:C-behandelten TLR3^{-/-}-Mäusen).

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass beide Signalwege über MDA5 oder TLR3, den jeweils anderen kompensieren können, falls einer nicht vorhanden ist. Allerdings

lässt sich vermuten, dass MDA5 in der Therapie mit Poly I:C in der akuten FV-Infektion weniger effizient ist, da das Fehlen von TLR3 während der Poly I:C-Behandlung einen reduzierten antiviralen Effekt aufwies.

Es wurde gezeigt, dass eine Behandlung mit Poly I:C in der akuten FV-Infektion zu einer starken Reduktion der Viruslast führte und die behandelten Mäuse keine Splenomegalie entwickelten. Zudem war dieser Effekt lang anhaltend, denn nach einer Poly I:C-Gabe in der akuten Phase der Infektion waren die suszeptiblen Mäuse gegen die Entstehung einer letalen Erythroleukämie geschützt, entwickelten aber eine chronische Infektion. Auch in der chronischen FV-Infektion wurde durch die therapeutische Gabe von Poly I:C die Viruslast in der Milz stark reduziert. Die beobachteten Effekte von Poly I:C sind abhängig von der endogenen Induktion von Typ I IFN, denn in IFN α -Rezeptor-Knockout-Mäusen bewirkte Poly I:C keine Abnahme der Viruslast. Es konnte zum Einen gezeigt werden, dass Poly I:C antiretroviral wirkte, indem antivirale Proteine wie OAS1a und PKR induziert wurden, welche die Virusreplikation und Translation inhibieren. Zum Anderen hatte die Injektion von Poly I:C immunomodulatorische Effekte. So kam es zur Aktivierung von B- und NK-Zellen. Zudem wurden CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aktiviert und deren Effektorfunktionen verbessert. Durch die Behandlung mit Poly I:C konnten virus-infizierte Zellen effektiver von CD8⁺ T-Zellen eliminiert werden. Eine starke Induktion von diversen Chemokinen in der Milz nach Poly I:C-Verabreichung resultierte in einer gezielten Rekrutierung von Immunzellen zum Entzündungsort und somit zu einer verbesserten Immunantwort. Folglich ist Poly I:C ein vielversprechender Kandidat zur Therapie von retroviralen Infektionen.

4.9 Poly I:C induziert viele verschiedene IFN α -Subtypen

Wie bereits im vorherigen Abschnitt beschrieben kommt es nach Poly I:C-Bindung an die Rezeptoren zu einer IRF3-abhängigen Induktion von IFN α . Alle beobachteten antiviralen Effekte von Poly I:C waren abhängig von Typ I IFN (siehe Abbildung 4.4). Dieses gehört zu einer Multigenfamilie, welche in der Maus aus 14 IFN α Subtyp-Genen, aber nur einem IFN β -Gen besteht (192). Obwohl alle verschiedenen IFN α -Subtypen an den gleichen Rezeptor binden (Interferon- α/β -Rezeptor, IFNAR), unterscheiden sich die verschiedenen Subtypen in ihrer biologischen Aktivität (39, 40, 58, 65, 96, 192). Daher wurde im nächsten Schritt die Frage beantwortet, welche IFN α -Subtypen von Poly I:C induziert werden. Dazu wurde einer suszeptiblen Maus (Y10A) 125 μ g Poly I:C appliziert und 4 h später die Milz entnommen. Als Kontrolle wurden naive Mäuse mitgeführt, um die konstitutive Expression der IFN α -Subtypen zu quantifizieren. Die Gesamt-RNA wurde isoliert und die Expression von 12 verschiedenen IFN α -Subtypen und IFN β analysiert.

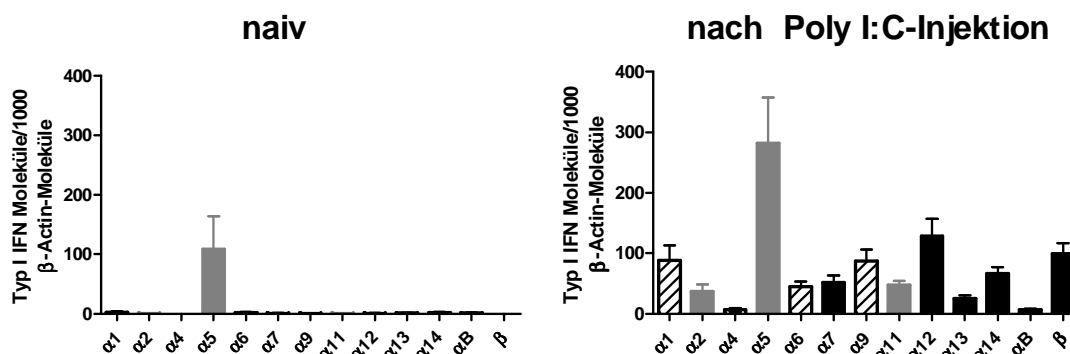


Abbildung 4.26 Expression von verschiedenen IFN α -Subtypen nach Poly I:C-Injektion

Y10A-Mäuse wurden mit Poly I:C behandelt und 4 h nach Injektion wurden die Milzen entnommen. Als Kontrolle dienten unbehandelte Y10A-Mäuse. Die Gesamt-RNA wurde mittels TRIZOL[®] isoliert. Die Anzahl der mRNA-Moleküle von verschiedenen IFN α -Subtypen wurde mittels quantitativer Echtzeit-PCR bestimmt. Mindestens 2 unabhängige Experimente wurden durchgeführt und die Proben wurden jeweils in Doppelbestimmungen untersucht. Der Durchschnitt von 4 Mäusen pro Gruppe (+ SEM) sind gezeigt.

In Abbildung 4.26 ist zu sehen, dass in naiven Mäusen konventionell nur der IFN α Subtyp 5 exprimiert wurde. Nach Poly I:C-Injektion kam es zur Induktion aller IFN α -Subtypen. Besonders stark wurde der Subtyp 5 nach Poly I:C-Gabe exprimiert. Die IFN α -Subtypen 1, 9, 12 und IFN β wurden moderat exprimiert, wohingegen die Expression der IFN α -Subtypen 4 und B sehr gering war. Daher stellte sich die Frage, ob die unterschiedlich starke Expression der IFN α -Subtypen mit der antiretroviralen

Aktivität dieser korreliert. Da die antivirale Aktivität von 4 Subtypen vorher bereits untersucht wurde (IFN α 1, 4, 6, 9) (65), sollte im Rahmen dieser Arbeit die biologische Aktivität von IFN α 2, 5 und 11 (graue Balken) untersucht werden, da uns diese freundlicherweise von Frau Dr. Cassandra James (*Division of Health Sciences, Murdoch University, Perth, Australia*) als DNA-Konstrukt überlassen wurden. Die DNA-Konstrukte wurden in 293T-Zellen transfiziert, in welchen die Plasmide translatiert und das synthetisierte Protein in den Überstand abgegeben wurde. Die Proteinkonzentration der verschiedenen Subtypen wurde mittels *in vitro* Bioassay (siehe 3.10) und ELISA (siehe 3.13.1) bestimmt.

4.10 IFN α 5 und IFN α 11 wirken antiretroviral *in vitro*

Zunächst wurde die antiretrovirale Wirkung der 3 verschiedenen IFN α -Subtypen *in vitro* getestet (siehe 3.9). Dazu wurden *Mus dunni* Zellen für 24 h mit IFN α inkubiert, bevor F-MuLV zu den Zellen gegeben wurde. Wenn die IFN α -Subtypen einen antiretroviralen Effekt haben, so hemmen sie die Virusreplikation in den infizierten Zellen. Da F-MuLV-infizierte Zellen das FV-*Envelop*-Antigen auf ihrer Oberfläche exprimieren, lassen sich diese später mit spezifischen Antikörpern anfärben und quantifizieren.

Wie in Abbildung 4.27 zu sehen ist, kam es im Falle von IFN α 5 und IFN α 11 zu einer Hemmung der Virusreplikation, jedoch in unterschiedlicher Stärke. IFN α 11 reduzierte die Anzahl der Virusfoci signifikant, auch bei einer eingesetzten Konzentration von 125 pg/ml. Die höchste eingesetzte IFN α 11-Konzentration von 2000 pg/ml verringerte die Anzahl der Virusfoci um 80%. IFN α 5 inhibierte die FV-Replikation signifikant, jedoch lag das Maximum der Reduktion der Virusfoci bei 50% (1000 pg/ml eingesetzte IFN α 5-Konzentration), was aber deutlich weniger effizient war als IFN α 11. Im Gegensatz dazu wies IFN α 2 keine antivirale Aktivität auf, da keine Abnahme der Anzahl der Virusfoci zu messen war. Um auszuschließen, dass bei der Translation des IFN α 2 DNA-Konstrukts eventuell ein Fehler aufgetreten ist, oder das Protein falsch gefaltet wurde, wurde der Test mit einem kommerziell erworbenen rekombinantem IFN α 2 (eBioscience) wiederholt. Auch hier ist zu sehen, dass dieser Subtyp keine antiretrovirale Aktivität *in vitro* hatte.

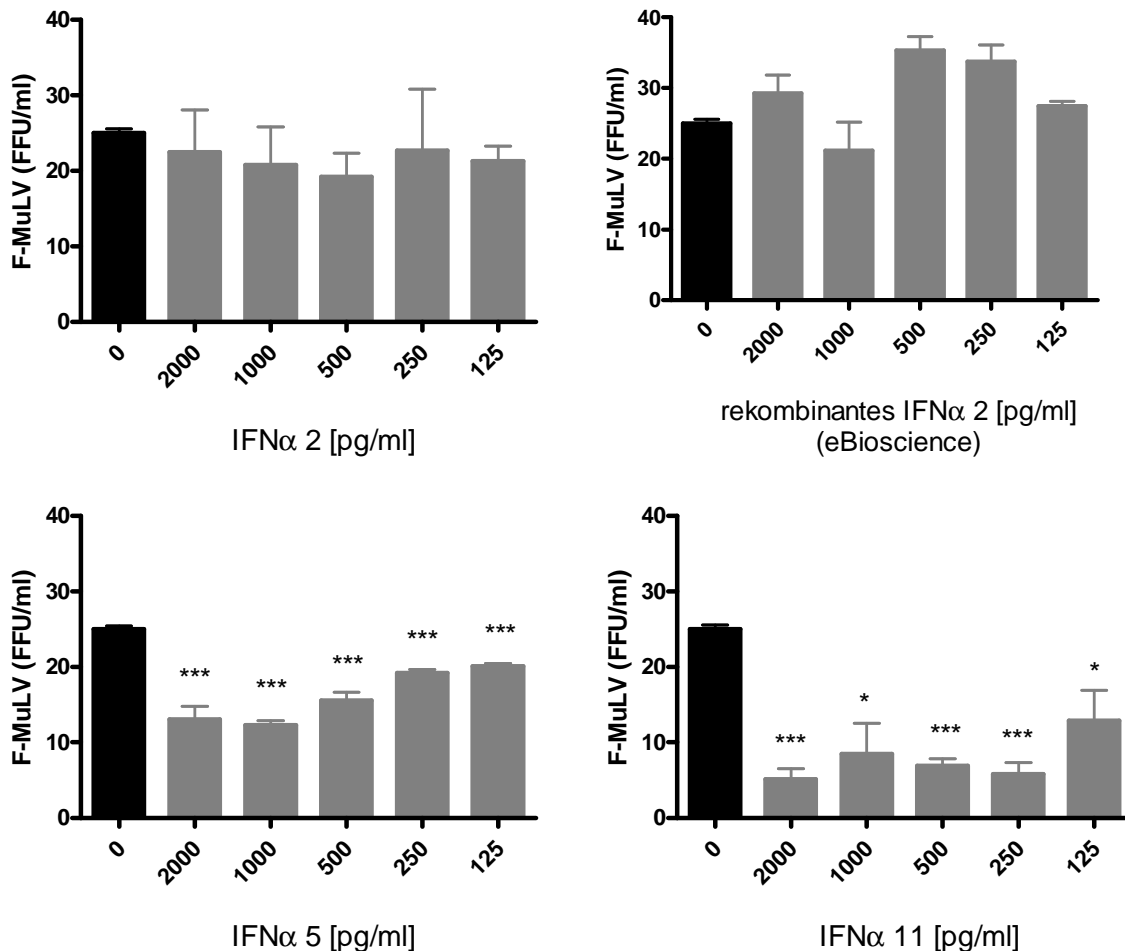


Abbildung 4.27 Antivirale Effekte von diversen IFNα-Subtypen *in vitro*

Mus dunni Zellen wurden *in vitro* 24h mit 2000 bis 125 pg/ml der IFNα-Subtypen 2, 5, 11 und kommerziell erworbenen rekombinantem IFNα2 (eBioscience) vorbehandelt. Die Inhibition der viralen Replikation wurde 4 Tage nach der Infektion der Zellen mit 25 FFU (*focus forming units*) F-MuLV bestimmt. Die Inhibition jedes IFNα-Subtypen wurde als Dreifachbestimmung gemessen. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte (+SEM) von zwei voneinander unabhängigen Experimenten. Die Unterschiede zwischen den IFNα-behandelten Zellen und den unbehandelten Zellen wurden mit Hilfe des „*student t Test*“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den unbehandelten und den IFNα-Subtypen behandelten Zellen Gruppen sind dargestellt durch * < 0,05; ** < 0,005; *** < 0,0005.

4.11 Behandlung mit IFNα11 in der akuten FV-Infektion führt zur Reduktion der Viruslast

Im Falle von IFNα5 und IFNα11, jedoch nicht für IFNα2 konnte *in vitro* eine antivirale Aktivität gegen FV gezeigt werden. Daher wurde in einem weiteren Versuch der antivirale Effekt der verschiedenen Subtypen *in vivo* untersucht.

Suszeptiblen Y10A-Mäusen wurden zu den Zeitpunkten -1 bis +9 Tage nach Infektion mit 5000 SFFU FV IFN α -Subtypen (5×10^4 pg in 500 μ l) i.p. injiziert. 10 Tage nach der Infektion wurden die Mäuse getötet, das Milzgewicht und die Anzahl der infektiösen Zellen in der Milz bestimmt.

Wie in Abbildung 4.29 zu erkennen ist, entwickelten die Mäuse, welche mit IFN α 11 behandelt wurden, keine Splenomegalie (mittleres Milzgewicht: 0,5 g), wohingegen eine tägliche Gabe von IFN α 5 eine Splenomegalie nicht verhindern konnte (durchschnittliches Milzgewicht: 1,6 g; unbehandelte Kontrollen: 1,7 g). Auch die Mäuse, die mit IFN α 2 behandelt wurden, entwickelten eine Splenomegalie (im Mittel: 1,1 g und im Falle des kommerziell erworbenen IFN α 2 1,66 g). Auch die Viruslast in der Milz wurde durch IFN α 5 und IFN α 2 nicht signifikant verringert (IFN α 5: 1×10^7 infizierte Zellen pro Milz; IFN α 2: $9,8 \times 10^6$ infizierte Zellen pro Milz; kommerziell erworbenes IFN α 2: $2,5 \times 10^7$ infizierte Zellen in der Milz und unbehandelte Kontrolle: 2×10^7 infizierte Zellen in der Milz). Die Therapie mit IFN α 11 führte hingegen zu einer starken Hemmung der Virusreplikation, so dass eine Abnahme der Viruslast um den Faktor 20 zu messen war (1×10^6 infizierte Zellen in der Milz). Somit hat IFN α 5, welches besonders stark durch Poly I:C induziert wurde, *in vivo* keine antivirale Aktivität gegen FV. Im Falle von IFN α 11, welches schwächer nach Poly I:C-Injektion exprimiert wurde, wurde eine starke antivirale Aktivität gegen FV sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beobachtet. Wie bereits gezeigt wurde, führte eine Behandlung mit dem artifiziellen dsRNA-Polymer Poly I:C zu einer 200-fachen Reduktion der Viruslast in der akuten FV-Infektion (vergleiche Abbildung 4.3). Somit resultierte die IFN α 11-Therapie in einer nicht ganz so starken Verminderung der Viruslast verglichen mit Poly I:C.

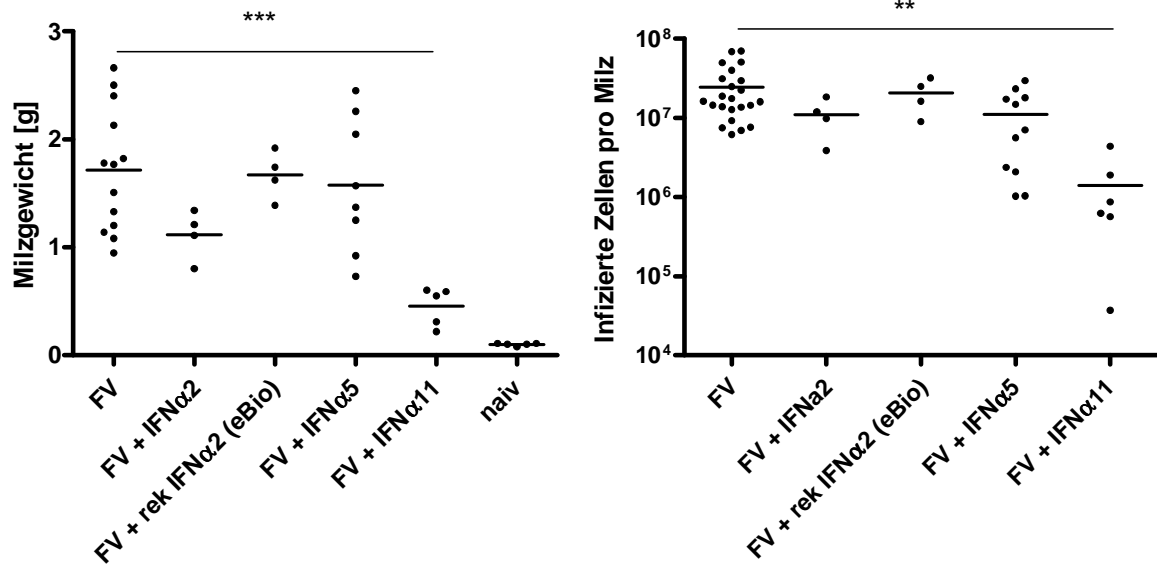


Abbildung 4.29 Antivirale Effekte von diversen IFNα-Subtypen

Suszeptible Y10A-Mäuse wurden zu den Zeitpunkten -1 bis +9 Tage nach Infektion mit FV mit den IFNα-Subtypen α2, α5, α11 und kommerziell erworbenen rekombinanten α2 (eBioscience) behandelt. 10 Tage nach Infektion wurde das Milzgewicht (A) und die Anzahl der infektiösen Zellen in der Milz mittels „*Infectious center assays*“ (B) bestimmt. Mindestens 4 Mäuse pro Gruppe wurden in der akuten Infektion auf ihre Viruslast in der Milz untersucht und die Mittelwerte für jede Gruppe sind durch einen Querbalken dargestellt. Die Unterschiede zwischen den IFNα-Subtypen-behandelten Mäusen und den Kontrollen wurden mit Hilfe des „*student t Test*“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt durch * < 0,05; ** < 0,005; *** < 0,0005.

4.12 Modulatorische Effekte von IFN α 11 auf Immunzellen

Es ist bekannt, dass IFN α neben direkten antiviralen auch biologische Effekte auf Immunzellen wie NK-Zellen, Makrophagen und T-Zellen hat (siehe 1.1.1.3.3). Dies ist in dieser Arbeit auch für die Poly I:C-induzierte IFN α -Antwort gezeigt worden. Daher sollte in weiteren Experimenten genauer analysiert werden, auf welche Immunzellen IFN α 11 wirkt. Wie bereits erwähnt, binden alle Subtypen an den gleichen Rezeptor, welcher von praktisch jeder Zelle auf der Oberfläche exprimiert wird. Dennoch sind unterschiedliche biologische Eigenschaften (antiviral, antiproliferativ, immunomodulatorisch) der verschiedenen Subtypen bekannt. Daher stellte sich die Frage, ob der Subtyp IFN α 11 immunomodulatorische Eigenschaften hat, und wenn dies der Fall ist, auf welche Zellen er genau wirkt.

4.12.1 IFN α 11-Behandlung in der akuten FV-Infektion erhöht die Anzahl an aktivierten B-Zellen

Im ersten Schritt wurde die Aktivierung von B-Zellen nach IFN α 11-Behandlung analysiert. Es wurde in anderen Arbeiten bereits gezeigt, dass eine Stimulation von B-Zellen mit IFN α zu einem verbesserten Überleben von B-Zellen führt. Zudem kommt es nach IFN α -Stimulation zu einer verstärkten Expression von Aktivierungsmarkern (CD69, CD86), jedoch nicht zu einer B-Zellproliferation (25).

Wie in Abbildung 4.30 zu sehen ist, führte IFN α 11 in der akuten FV-Infektion zu einer Zunahme an aktivierten (CD69⁺) B-Zellen (14.000 aktivierte B-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten verglichen mit 4000 in den unbehandelten Kontrollen). Die Ergebnisse zeigen, dass der Subtyp IFN α 11 B-Zellen aktivieren konnte.

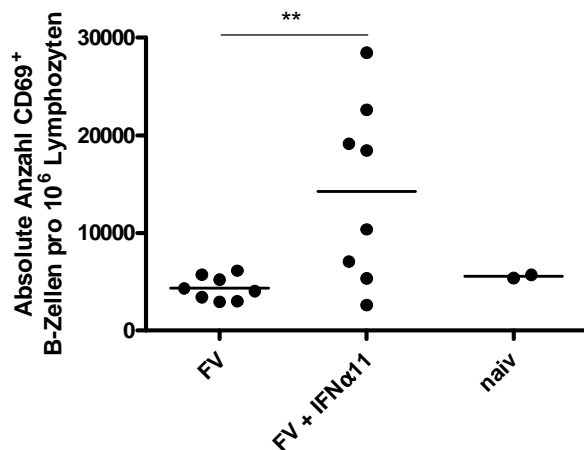


Abbildung 4.30 Untersuchung der Aktivierung von B-Zellen nach IFN α 11-Behandlung

Susceptible Y10A-Mäuse wurden zu den Zeitpunkten -1 bis +9 Tage nach Infektion mit FV mit IFN α 11 behandelt. 10 Tage nach FV-Infektion wurden lebendige Milzzellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Oberflächenexpression des Aktivierungsmarkers CD69 von CD19⁺ B-Zellen wurde untersucht. Die absolute Anzahl von aktivierten B-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten ist dargestellt. Mindestens 4 Mäuse pro Gruppe wurden untersucht und die Mittelwerte für jede Gruppe sind durch einen Querbalken dargestellt. Die Unterschiede zwischen den IFN α 11-behandelten Mäusen und den Kontrollen wurden mit Hilfe des „*student t Test*“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt durch * < 0,05; ** < 0,005; *** < 0,0005.

4.12.2 IFN α 11-Behandlung in der akuten FV-Infektion erhöht die Anzahl an aktivierten NK-Zellen

Die Zytotoxizität von NK-Zellen während einer Virusinfektion wird von IFN α verstärkt und die Proliferation von NK-Zellen wird von IFN α verbessert (19, 21, 172). IFN α kontrolliert auch die Expression von anderen Zytokinen, wie IL-12 und IL-15, welche von großer Bedeutung für die NK-Zellantwort sind (38, 204).

Deshalb wurde untersucht, ob IFN α 11 auch einen Einfluss auf die NK-Zellaktivierung hat. In Abbildung 4.31 sind die Effekte der IFN α 11-Therapie auf NK-Zellen gezeigt.

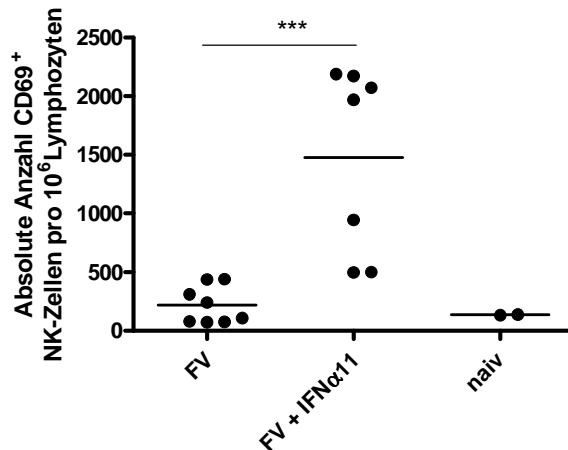


Abbildung 4.31 Untersuchung der Aktivierung von NK-Zellen nach IFN α 11-Behandlung

Suszeptible Y10A-Mäuse wurden zu den Zeitpunkten -1 bis +9 Tage nach Infektion mit FV mit IFN α 11 behandelt. 10 Tage nach FV-Infektion wurden lebendige Milzzellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Oberflächenexpression des Aktivierungsmarkers CD69 von NK1.1⁺ Zellen wurde untersucht. Die absolute Anzahl von aktivierten NK-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten ist dargestellt. Mindestens 4 Mäuse pro Gruppe wurden untersucht und die Mittelwerte für jede Gruppe sind durch einen Querbalken dargestellt. Die Unterschiede zwischen den IFN α 11-behandelten Mäusen und den Kontrollen wurden mit Hilfe des „student t Test“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt durch * < 0,05; ** < 0,005; *** < 0,0005.

Verglichen mit den unbehandelten Kontrollen (1500 aktivierte NK-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten vergleichen mit 200 in Kontrollmäusen) führte die Therapie mit IFN α 11 zu einer 7-fach höheren Anzahl an aktivierten (CD69) NK-Zellen in der Milz. IFN α 11 führt also in FV-infizierten Mäusen zu einer starken Aktivierung von NK-Zellen.

4.12.3 IFN α 11-Therapie induziert die Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen

Neben der bereits gezeigten aktivierenden Wirkung von IFN α 11 auf NK und B-Zellen sollte im Weiteren der Einfluss von IFN α auf die T-Zellantwort untersucht werden. Dazu wurden suszeptible Mäuse täglich, beginnend einen Tag vor der Infektion mit FV, mit IFN α 11 behandelt und an Tag 10 nach FV-Infektion erfolgte die Analyse der T-Zellantworten. In Abbildung 4.32 ist die Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen gezeigt. Nach IFN α 11-Gabe kam es zur verstärkten Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD69. In der Milz waren daher nach Verabreichung von IFN α 11 viermal mehr aktivierte CD4⁺ T-Zellen zu finden (im Durchschnitt 9000 aktivierte CD4⁺ T-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten in der Milz von behandelten Mäusen und 2200 bei Kontrollmäusen).

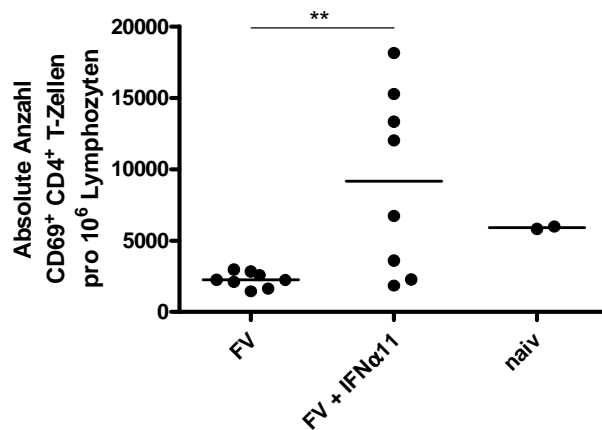


Abbildung 4.32 Untersuchung der Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen nach IFNα11-Therapie

Suszeptible Y10A-Mäuse wurden zu den Zeitpunkten -1 bis +9 Tage nach Infektion mit FV mit IFNα11 behandelt. 10 Tage nach FV-Infektion wurden lebendige Milzzellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Oberflächenexpression des Aktivierungsmarkers CD69 von CD4⁺ T-Zellen wurde untersucht. Die absolute Anzahl von aktivierten CD4⁺ T-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten ist dargestellt. Mindestens 4 Mäuse pro Gruppe wurden untersucht und die Mittelwerte für jede Gruppe sind durch einen Querbalken dargestellt. Die Unterschiede zwischen den IFNα11-behandelten Mäusen und den Kontrollen wurden mit Hilfe des „*student t Test*“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt durch * < 0,05; ** < 0,005; *** < 0,0005.

Auch die Anzahl an virus-spezifischen CD4⁺ T-Zellen wurde mittels Tetramer-II-Färbung in der Milz von behandelten Mäusen gemessen. In IFNα11-behandelten Tieren war die Anzahl an virus-spezifischen CD4⁺ T-Zellen um das 2,7-fache erhöht verglichen mit infizierten Kontrolltieren.

Die tägliche Gabe von IFNα11 führte also während der akuten FV-Infektion zu einer verstärkten Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen und zu einem Anstieg der absoluten Zahl an FV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen in der Milz.

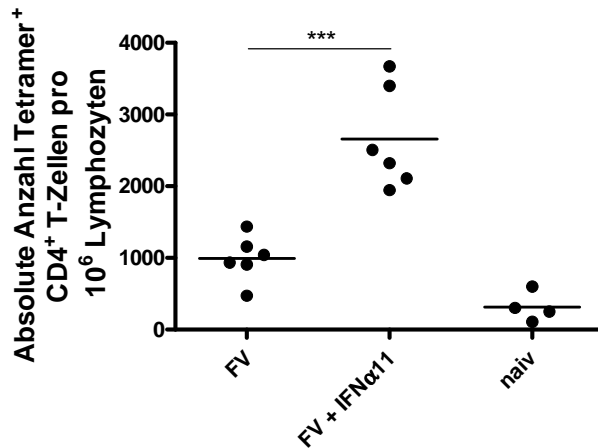


Abbildung 4.33 Absolute Anzahl von FV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen nach IFNα11-Therapie

Suszeptible Y10A-Mäuse wurden zu den Zeitpunkten -1 bis +9 Tage nach Infektion mit FV mit IFNα11 behandelt. 10 Tage nach FV-Infektion wurden lebendige Milzzellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Anzahl virus-spezifischer CD4⁺ T-Zellen wurde mittels Tetramer-Färbung untersucht. Die Mittelwerte (+SEM) der absoluten Anzahl von Tetramer⁺ CD4⁺ T-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten ist dargestellt. Mindestens 4 Mäuse pro Gruppe wurden untersucht. Die Unterschiede zwischen den IFNα11-behandelten Mäusen und den Kontrollen wurden mit Hilfe des „*student t Test*“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt durch * < 0,05; ** < 0,005; *** < 0,0005.

4.12.4 IFNα11-Therapie induziert die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen

Neben der T-Helferzellantwort, wurde im Weiteren die Antwort von zytotoxischen T-Lymphozyten untersucht. Diese spielen neben NK-Zellen eine große Rolle in der Elimination von virus-infizierten Zellen. Die Tiere wurden während der akuten FV-Infektion, wie in Abbildung 4.28 schematisch dargestellt, täglich mit IFNα11 behandelt und an Tag 10 nach Infektion die CD8⁺ T-Zellantwort in der Milz untersucht. Als Kontrolle dienten unbehandelte, FV-infizierte Mäuse.

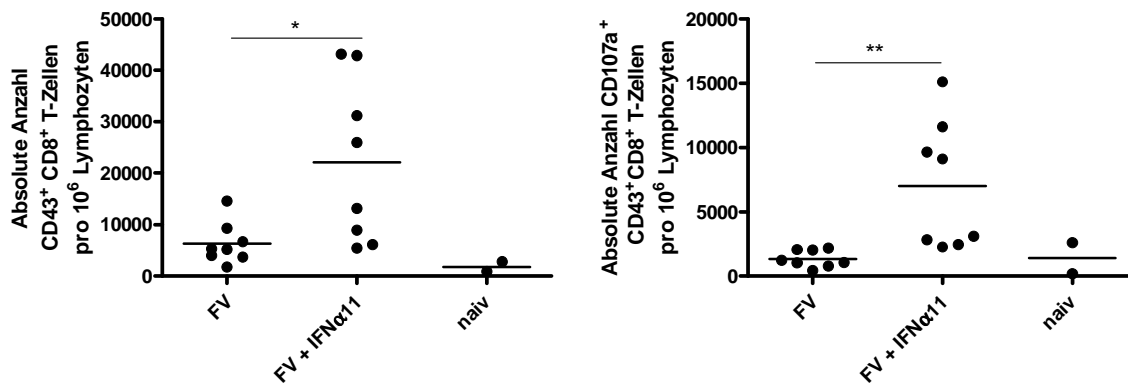


Abbildung 4.34 Untersuchung der Effektorfunktion von CD8⁺ T-Zellen nach IFNα11-Therapie

Suszeptible Y10A-Mäuse wurden zu den Zeitpunkten -1 bis +9 Tage nach Infektion mit FV mit IFNα11 behandelt. 10 Tage nach FV-Infektion wurden lebendige Milzzellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Oberflächenexpression des Aktivierungsmarkers CD43 und des Degranulationsmarkers CD107a von CD8⁺ T-Zellen wurde untersucht. Die absolute Anzahl von aktivierten und degranulierenden CD8⁺ T-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten ist dargestellt. Mindestens 4 Mäuse pro FV-infizierter Gruppe wurden untersucht und die Mittelwerte für jede Gruppe sind durch einen Querbalken dargestellt. Die Unterschiede zwischen den IFNα11-behandelten Mäusen und den Kontrollen wurden mit Hilfe des „student t Test“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt durch * < 0,05; ** < 0,005; *** < 0,0005.

Die IFNα11-Therapie resultierte in einer verstärkten Expression des Aktivierungsmarkers CD43 auf den CD8⁺ T-Zellen in der Milz. Es waren etwa viermal so viele aktivierte CD8⁺ T-Zellen (22.000 CD43⁺ CD8⁺ T-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten) in der Milz von behandelten Mäusen verglichen mit infizierten Kontrolltieren (5000 CD43⁺ CD8⁺ T-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten) zu finden (siehe Abbildung 4.34). Auch die Effektorfunktion dieser war signifikant verbessert, denn es degranulierten (CD107a⁺) mehr aktivierte CD8⁺ T-Zellen in den behandelten Tieren (7000 CD107a⁺ CD43⁺ CD8⁺ T-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten) als in den unbehandelten Mäusen (1300 CD107a⁺ CD43⁺ CD8⁺ T-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten; siehe Abbildung 4.34).

In Abbildung 4.35 ist außerdem gezeigt, dass die Behandlung mit IFNα11 zu einer Zunahme an FV-spezifischen (Tetramer-I⁺) CD43⁺ CD8⁺ T-Zellen führte (4000 Tet-I⁺ CD43⁺ CD8⁺ T-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten verglichen mit 1000 in der Milz von Kontrolltieren).

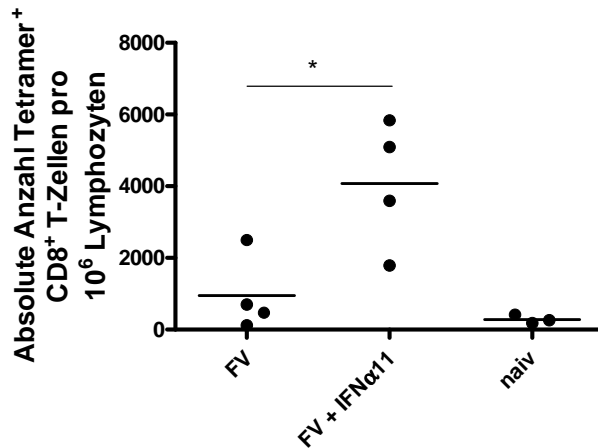


Abbildung 4.35 Untersuchung von FV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen nach IFNα11-Therapie

Suszeptible Y10A-Mäuse wurden zu den Zeitpunkten -1 bis +9 Tage nach Infektion mit FV mit IFNα11 behandelt. 10 Tage nach FV-Infektion wurden lebendige Milzzellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Anzahl virus-spezifischer CD8⁺ T-Zellen wurde mittels Tetramer-Färbung untersucht. Die absolute Anzahl von Tetramer⁺ CD8⁺ T-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten ist dargestellt. Mindestens 4 Mäuse pro Gruppe wurden untersucht und die Mittelwerte für jede Gruppe sind durch einen Querbalken dargestellt. Die Unterschiede zwischen den IFNα11-behandelten Mäusen und den Kontrollen wurden mit Hilfe des „student t Test“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt durch * < 0,05; ** < 0,005; *** < 0,0005.

Die Untersuchung der verschiedenen IFNα-Subtypen zeigte, dass diese sehr unterschiedliche antiretrovirale Eigenschaften *in vitro* und *in vivo* hatten. IFNα11, welches als einziges der untersuchten Subtypen antiretrovirale Effekte *in vivo* zeigte, hatte starke immunomodulatorische Effekte. Es führte zu einer Aktivierung von NK, B und T-Zellen und verbesserte die Effektorfunktion von CD8⁺ T-Zellen. Des Weiteren war eine Zunahme an FV-spezifischen T-Zellen zu beobachten, was nach Poly I:C-Gabe nicht der Fall war (vergleiche Abbildung 4.16 und Abbildung 4.20). Die Therapie mit Poly I:C führte zur Expression aller IFNα-Subtypen *in vivo*, jedoch wurde der Subtyp IFNα11, welcher besonders starke antiretrovirale Eigenschaften hatte, nur sehr moderat exprimiert. Allerdings konnte die gezielte therapeutische Behandlung mit einem IFNα Subtyp (IFNα11) die Viruslast der Mäuse erfolgreich reduzieren und die Entwicklung einer Splenomegalie verhindern.

5 Diskussion

Das angeborene Immunsystem dient der ersten Erkennung von eingedrungenen Pathogenen. Dies erfolgt durch diverse Mustererkennungsrezeptoren und es kommt anschließend zur Einleitung einer Immunantwort gegen die Erreger. Daher ist es für Therapien von Interesse, genau dort einzugreifen und die körpereigene Immunantwort zu verbessern. Ein besonderes Augenmerk liegt dabei auf den Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLR) und deren Liganden. So finden diese mittlerweile Anwendung in der Behandlung von Krebserkrankungen, Allergien und auch von viralen Infektionen. Eine weitere Nutzung ist die Verwendung dieser Liganden als Adjuvantien bei Impfungen. So sind mittlerweile Impfstoffe gegen das Hepatitis B Virus zugelassen, welche Monophosphoryllipid A, einen synthetischen Liganden des TLR4, zur Verstärkung der Immunantwort nutzen (Fendrix, GlaxoSmithKline; Supravax, Dynavax Technologies). Besonders Agonisten für die in den Endosomen lokalisierten TLR (TLR3, 7 und 9), die virale Nukleinsäuren erkennen, scheinen gute Aussichten für den Einsatz bei einer Behandlung von Infektionskrankheiten zu haben. So ist heutzutage ein TLR7-Agonist zur topischen Behandlung von Basalzellhautkrebs und Feigwarzen, welche durch das Humane Papillomavirus verursacht werden, auf dem Markt (Aldara[®], 3M Pharma). Nach Bindung des TLR7-Liganden Imiquimod an seinen Rezeptor kommt es zu einer lokalen Entzündungsreaktion und der IRF7- und MyD88-abhängigen Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Typ I IFN (14, 91, 185). Dies resultiert in der Eliminierung der virus-infizierten Zellen bzw. Tumorzellen. Somit wirkt Aldara[®] als Immunmodulator, indem es nicht direkt das Virus bzw. den Tumor bekämpft, sondern die körpereigene Immunantwort verstärkt und damit eine neue Art der Therapie darstellt.

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einsatz von Immunmodulatoren zur Verbesserung der Immunantwort gegen retrovirale Infektionen untersucht werden. Dazu wurden FV-infizierte Mäuse mit dem TLR3- und MDA5-Liganden Poly I:C behandelt, der eine starke Typ I IFN-Antwort in Abhängigkeit von IRF3 in naiven Mäusen induziert (6). Das gebildete Typ I IFN induziert einen antiviralen Status in infizierten Zellen. Dies bedeutet, dass zum Einen antivirale Enzyme wie PKR, OAS und Mx-Proteine gebildet werden (68, 132), welche direkt die virale Transkription und Translation inhibieren. Zum Anderen werden durch das gebildete IFN α Gene stimuliert und transkribiert, welche wichtig in der Antigenprozessierung sind. Folglich

werden Virusantigene effektiver prozessiert und auf der Oberfläche von APC präsentiert (52, 74). Dies führt zur verstärkten Aktivierung von T-Zellen, was wiederum in der verbesserten Erkennung und Eliminierung von virus-infizierten Zellen durch CD8⁺ T-Zellen resultiert. Eine weitere Wirkung von Typ I IFN liegt in der Modulation von Immunzellfunktionen. Typ I IFN reguliert z.B. die Zytotoxizität von NK-Zellen und deren Proliferation (20, 141, 167, 190). IFN α/β kann direkt die Expression von Perforin induzieren und somit die zytotoxische Aktivität von NK und CD8⁺ T-Zellen regulieren (11, 190). Außerdem erhöht Typ I IFN im Falle von NK-Zellen die Produktion und Sekretion anderer Zytokine wie z.B. IFN γ , das wiederum autokrin wirkt und weitere Zytokine induziert (141, 167). IFN α kann zudem direkt CD8⁺ T-Zellen aktivieren und die Proliferation dieser anregen (42, 91, 107, 119, 188). Durch die diversen Wirkungen von Poly I:C-induziertem IFN α/β , ist dieser Ligand ein verheißungsvoller Kandidat zur Behandlung von Virusinfektionen.

Es wurde bereits gezeigt, dass während retroviralen Infektionen wie HIV, SIV und FV (67) die Typ I IFN-Antwort sehr schwach ist. Auch Infektionen mit dem murinen Retrovirus LP-BM5 MuLV, welches murines AIDS induziert, führt zu keinem messbarem Typ I IFN Spiegel im Serum (86). Während einer akuten HIV-1 Infektion ist aufgrund einer reduzierten Anzahl plasmazytoider DC, welche die wichtigsten IFN α -Produzenten sind, kaum IFN α nachweisbar (100). Dies war auch in chronischen HIV-Infektionen zu beobachten (54). In SIV-Infektionen wurde gezeigt, dass IFN α kurzzeitig im Blut und den Lymphknoten von Rhesusmakaken nachweisbar ist, allerdings wurde die Viruslast dadurch nicht signifikant verändert (105).

IFN α wurde in den Achtziger Jahren als ein potentiell erstes anti-HIV-Therapeutikum untersucht (47, 114, 177, 194). In *in vitro*-Studien mit HIV konnte gezeigt werden, dass eine Induktion von Typ I IFN durch die Behandlung mit Poly I:C zu einer Inhibition der Virusreplikation führte (189). *In vivo*-Studien mit IFN α zur Therapie von HIV-Patienten zeigten sehr unterschiedliche Ergebnisse. So konnte in der asymptomatischen Phase der Infektion gezeigt werden, dass eine Behandlung mit Typ I IFN zu einer Stabilisierung der CD4⁺ T-Zellen führt, was allerdings in einer späteren Phase der Infektion nicht mehr der Fall war (110, 118). Eine andere Studie zeigte, dass es während der HIV-Infektion zu einer Verminderung der Expression des Typ I IFN Rezeptors kam. Daher folgerten Hardy *et al.*, dass es während der Infektion zu einer Unempfindlichkeit gegen IFN α kommt (75). In neueren Studien wurde gezeigt, dass der Einsatz von IFN α in Kombination mit Zidovudin und

Zalcitabin (nukleosidische Reverse Transkriptase Inhibitoren) im Vergleich zu einer Behandlung ohne IFN α zu einer signifikanten Abnahme der HIV RNA-Konzentration im Plasma führt (73). Eine weitere Therapiestudie mit IFN α bei Patienten, welche bisher keine andere Therapie erhalten hatten, zeigte, dass es in der frühen HIV-Infektion zu einer Abnahme der Viruslast um den Faktor 10 kam (82). Auch Angel *et al.* zeigten, dass eine Behandlung von HIV-Patienten mit pegyliertem IFN α zu einer Dosis-abhängigen Reduktion der Viruslast führte (bis zu 0,5 log₁₀). In dieser Studie wurde neben den antiviralen Effekten auch die Aktivierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen untersucht. Es wurde nach der Behandlung mit pegyliertem IFN α keine Zunahme an Gedächtnis-CD4⁺ T-Zellen (CD45RO⁺) und aktivierten CD8⁺ T-Zellen (CD38⁺ HLA-DR⁺ bzw. CD28⁺) beobachtet (9). Somit wurde neben den antiviralen Effekten keine Wirkung von IFN α auf den Aktivierungsstatus von Immunzellen beschrieben. Dies deckt sich einerseits mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, da während der Behandlung mit Poly I:C Typ I IFN-abhängig antivirale Effekte gegen FV nachgewiesen wurden (siehe Abbildung 4.3 und Abbildung 4.4). Andererseits wurde in dieser Arbeit neben den antiviralen Effekten durch Poly I:C-induziertes IFN α auch eine erhöhte Anzahl an aktivierten CD8⁺ T-Zellen und eine verbesserte Effektorfunktion dieser gezeigt.

Die Therapie mit Poly I:C während der akuten FV-Infektion zeigte eine IFN α -abhängige Reduktion der Viruslast, die Verhinderung einer Splenomegalie und einer letalen Erythroleukämie (siehe Abbildung 4.7). Diese beobachteten Effekte waren nur abhängig von IFN α , denn in IFN α Rezeptor-defizienten Mäusen (IFNAR^{-/-}) konnte eine Injektion von Poly I:C die Viruslast nicht reduzieren (siehe Abbildung 4.4). IFN β und IFN α 4 werden zwar IRF7-unabhängig gebildet, jedoch kann, durch das Fehlen des Rezeptors, die Expression anderer IFN-Subtypen bzw. IFN-stimulierter Gene nicht induziert werden. Dies zeigte sich auch in der Untersuchung der antiviralen Enzyme OAS und PKR. In wildtyp-Tieren kam es durch die Injektion von Poly I:C zu einer erhöhten Expression von PKR und OAS mRNA, wohingegen in den IFNAR^{-/-}-Mäusen keine verstärkte Expression der beiden Enzyme auf mRNA-Ebene zu beobachten war (siehe Abbildung 4.10). Die Bedeutung von IFN α in Virusinfektionen wurde mit Hilfe der IFNAR^{-/-}-Mäuse in diversen Mausmodellen genauer charakterisiert. Durch das Fehlen des Typ I IFN-Rezeptors waren Mäuse nicht mehr in der Lage die Replikation verschiedenster Viren zu inhibieren. Dazu gehören Studien mit dem Vaccinia Virus, dem Semliki Forest Virus, dem Lymphozytären Choriomeningitis Virus (145), dem Blauzungenvirus (29), dem Herpesvirus papio 2

(166), dem Hämorrhagischem Krim-Kongo Fiebevirus (16), dem Murray Valley Enzephalitisvirus (125) und dem Maushepatitis Coronavirus (163). In Mäusen, welche mit FV und LDV infiziert wurden, wurde bereits die Rolle von Typ I IFN genauer untersucht. Dabei wurde in defizienten Mäusen (IFNAR^{-/-}) eine erhöhte Viruslast verglichen mit wildtyp-Mäusen gefunden (67). In akuten FV-Infektionen ohne LDV wird nur wenig IFN α -Protein induziert (66) (siehe Abbildung 4.1), so dass eine exogene Gabe von IFN α die Immunantwort des Wirtes verbessern könnte.

Viele andere Studien mit Nicht-Retroviren haben gezeigt, dass Poly I:C antivirale Effekte *in vivo* hat (10, 56, 87, 127, 148). Neben der Induktion von Typ I IFN wurde auch die Expression der verschiedenen antiviralen Enzyme untersucht, allerdings wurden in keiner dieser Arbeiten die immunomodulatorischen Effekte von Poly I:C analysiert. IFN α wird bisher in humanen Virusinfektionen zur Behandlung des Hepatitis B und Hepatitis C Virus eingesetzt. Dabei kommt es zu Beginn der IFN α -Therapie zur schnellen Abnahme der Viruslast. Das Virus wird jedoch während dieser Phase nicht komplett eliminiert (149). Während der weiteren Behandlung mit IFN α kommt es zur langsamen Reduktion der Viruslast, was bis zur vollständigen Eliminierung führen kann. Dies könnte dadurch zu Stande kommen, dass in der frühen Phase durch IFN α antivirale Enzyme exprimiert werden. Folglich wird die Virusreplikation rasch inhibiert, allerdings führt dies nicht zur kompletten Eliminierung des Virus. Im späteren Verlauf werden wahrscheinlich modulatorische Effekte von IFN α auf Immunzellen für die vollständige Entfernung des Virus wichtig (53). Demzufolge spielt IFN α beim Einsatz in der antiviralen Therapie eine doppelte Rolle, was bei der Erforschung von antiviralen Mechanismen während der Poly I:C-Therapie berücksichtigt werden muss.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass eine Poly I:C-Behandlung während einer akuten FV-Infektion zur Aktivierung von Immunzellen wie NK-, B- und T-Zellen führte (siehe Abbildung 4.11, Abbildung 4.13, Abbildung 4.17 und Abbildung 4.21). Es wurde allerdings keine Expansion von virus-spezifischen T-Zellen beobachtet, jedoch hatten diese nach der Behandlung mit Poly I:C eine verbesserte Effektorfunktion. Andere Berichte über den Einfluss von IFN α auf die T-Zellantwort unterstützen diese Erkenntnisse. So induziert IFN α z.B. die Reifung von DC und sichert deren Überleben, was zu einer verbesserten Antigenpräsentation führt und somit zur Aktivierung von T-Zellen kommt (188). Vom LCMV-Modell ist bekannt, dass IFN α eine entscheidende Rolle in der CD8⁺ T-Zellaktivierung spielt, da IFN α

unabdingbar für eine optimale klonale Expansion dieser Zellen ist (3, 107). Zusätzlich ermöglicht IFN α die Kreuzpräsentation von exogenen Antigenen für CD8 $^{+}$ T-Zellen über MHC Klasse I auf DC (119). Die Reduktion der Viruslast während der FV-Infektion hängt ganz entscheidend von CD8 $^{+}$ T-Zellen ab (78, 79, 165), was auch in dieser Arbeit durch Depletionsexperimente gezeigt wurde. Nach Depletion der CD8 $^{+}$ T-Zellen während der akuten FV-Infektion konnte die Virusreplikation nicht mehr kontrolliert werden und auch die antiviralen Effekte von Poly I:C waren ohne CD8 $^{+}$ T-Zellen nicht mehr nachweisbar. So entwickelten die Mäusen trotz Poly I:C-Behandlung eine schwere Splenomegalie (siehe Abbildung 4.15). Die bedeutende Rolle von CD8 $^{+}$ T-Zellen während der FV-Infektion wurde bereits in anderen Arbeiten analysiert. CD8 $^{+}$ T-Zellen spielen für die Rekonvaleszenz von der akuten Phase der FV-Infektion eine kritische Rolle (79, 165). In der akuten FV-Infektion führt eine Depletion von CD8 $^{+}$ T-Zellen in resistenten Mäusen zu einer stark erhöhten Viruslast und einer Splenomegalie (202, 203). Die CD8 $^{+}$ T-Zellantwort in der akuten FV-Infektion wird durch IFN γ , Fas-FasL und zytotoxische Moleküle wie z.B. Granzym A und B und Perforin vermittelt (202) und in der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass CD8 $^{+}$ T-Zellen eine gesteigerte Expression von Granzym B nach Behandlung mit Poly I:C aufwiesen. Somit kommt es nach Poly I:C-Behandlung zu einer verbesserten CD8 $^{+}$ T-Zellantwort, welche durch die Induktion von IFN α moduliert wurde.

In dieser Arbeit wurde nach Poly I:C-Behandlung keine Expansion an virus-spezifischen CD4 $^{+}$ T-Zellen beobachtet. Allerdings resultierte die Therapie mit Poly I:C in einer erhöhten Anzahl an aktivierten CD4 $^{+}$ T-Zellen. Es zeigte sich, dass CD4 $^{+}$ T-Zellen eine verbesserte Zytokinexpression nach Poly I:C-Therapie aufwiesen (siehe Abbildung 4.18). Die Hauptaufgabe von CD4 $^{+}$ T-Zellen ist die Expression diverser Zytokine wie IFN γ , TNF α und IL-2 (173). IFN γ und TNF α aktivieren Makrophagen und CD8 $^{+}$ T-Zellen, so dass eine zelluläre Immunantwort eingeleitet wird. IL-2 hingegen ist nötig für die Proliferation von T-Zellen und verbessert die CD8 $^{+}$ T-Zellantwort. So zeigten Studien anderer Infektionen, dass CD4 $^{+}$ T-Zellen, die diese drei Zytokine gleichzeitig produzieren, den besten Schutz gegen Infektionen bieten (44). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde nach Behandlung mit Poly I:C ein Anstieg an Einzel- und Doppelzytokinproduzenten in der CD4 $^{+}$ T-Zellpopulation beobachtet (siehe Abbildung 4.19), jedoch keine Zunahme an Dreifachzytokinproduzenten. Frühere Arbeiten zeigten, dass IFN γ , welches von CD4 $^{+}$ T-Zellen während der akuten FV-Infektion gebildet wurde, einen starken antiviralen

Effekt hatte (147). Auch für TNF α wurden antivirale Effekte gegen FV bereits nachgewiesen (32, 84). Folglich ist anzunehmen, dass die in dieser Arbeit beobachtete verbesserte Zytokinexpression der CD4⁺ T-Zellen nach Poly I:C-Behandlung während der akuten FV-Infektion den therapeutischen Effekt von Poly I:C teilweise vermittelt. Auch die Ergebnisse der Depletionsexperimente belegen dies (siehe Abbildung 4.15). So führte die Depletion von CD4⁺ T-Zellen während der Poly I:C-Behandlung in der akuten FV-Infektion zu einer erhöhten Viruslast. Darüber hinaus verursachte die Depletion die Ausbildung einer Splenomegalie. Die Mäuse waren also ohne CD4⁺ T-Zellen nicht in der Lage die Virusreplikation zu inhibieren und nach Stimulation des Immunsystems durch Poly I:C eine effiziente Immunantwort gegen FV einzuleiten. Diverse Effekte von IFN α auf CD4⁺ T-Zellen wurden bereits beschrieben. Während der Induktion einer Immunantwort begünstigt die Anwesenheit von IFN α die Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen zu T_H1 Zellen (155). Des Weiteren wurde gezeigt, dass eine *in vitro* IFN α -Stimulation von humanen CD4⁺ T-Zellen zu einer verstärkten Expression von IFN γ und IL-10 führt (8, 26, 169). Havenar-Daughton *et al.* zeigten, dass IFN α eine kritische Rolle in der klonalen Expansion von CD4⁺ T-Zellen hat, was jedoch abhängig vom entsprechenden Pathogen ist (83). Da eine Stimulation mit Poly I:C-induziertem IFN α in dieser Arbeit zu einer verbesserten CD4⁺ T-Zellantwort führte, korrelieren diese Ergebnisse mit den genannten Studien.

Die Behandlung mit Poly I:C während der akuten FV-Infektion resultierte in der Aktivierung von B- und NK-Zellen. Es wurden jedoch zu dem Zeitpunkt 10 dpi keine neutralisierenden oder bindenden Antikörper gefunden, und auch in B-Zell-defizienten Mäusen führte die Therapie mit Poly I:C zu einer signifikanten Abnahme der Viruslast (siehe Abbildung 4.12). Dies zeigt, dass B-Zellen für den Erfolg der Poly I:C-Therapie nicht benötigt werden. Auch die Depletion von NK-Zellen während der Poly I:C-Therapie in FV-infizierten Mäusen führte zu keiner signifikanten Veränderung der Viruslast verglichen mit Poly I:C-behandelten FV-infizierten Kontrolltieren (siehe Abbildung 4.15). Trotz Aktivierung der NK-Zellen durch die Behandlung mit Poly I:C hatten NK-Zellen keinen Einfluss auf die Effizienz der Therapie. Die Therapie mit Poly I:C hatte also nur in Anwesenheit von T-Zellen Erfolg.

Die Induktion von IFN α durch Poly I:C wird durch zwei verschiedenen Rezeptoren vermittelt: TLR3 und MDA5. TLR3 ist in den Endosomen von spezifischen Zellen z.B. DC, Makrophagen und NK-Zellen lokalisiert (85, 129) und erkennt virale dsRNA.

Durch die Bindung von Poly I:C oder dsRNA an TLR3 kommt es TRIF-abhängig zur Induktion von Typ I IFN und proinflammatorischen Zytokinen. Die im Zytoplasma lokalisierte Helikase MDA5 erkennt ebenfalls Poly I:C und dsRNA. Diese wird jedoch ubiquitär exprimiert und nach Bindung an die Helikase kommt es zu einer IPS-1-abhängigen Expression von Typ I IFN und proinflammatorischen Zytokinen. Diese Arbeit zeigte, dass nur das Vorhandensein eines der beiden Rezeptoren (TLR3 und MDA5) nötig für eine erfolgreiche Therapie mit Poly I:C während der akuten FV-Infektion ist. Bei Fehlen eines Rezeptors kann der jeweils andere dieses Defizit kompensieren, da in Mäusen, die defizient für MDA5 oder TLR 3 waren, ein Rezeptor für eine erfolgreiche Therapie mit Poly I:C genügte (siehe Abbildung 4.25). Es zeigte sich aber auch, dass das Fehlen von TLR3 einen reduzierten antiviralen Effekt von Poly I:C zur Folge hatte, wohingegen in MDA5-defizienten Mäusen ein ähnlicher antiviraler Effekt wie in Wildtyp-Mäusen nach Poly I:C-Behandlung zu beobachten war. Es wurde bereits beschrieben, dass beide Rezeptoren unterschiedliche Aufgaben in der Antwort auf Poly I:C besitzen. So ist bekannt, dass MDA5 für die Aktivierung von NK-Zellen nach Poly I:C-Stimulation wichtiger ist als TLR3 (130). Dieser Effekt wurde auch in einer anderen Studie beschrieben, die eine Poly I:C-vermittelte NK-Zellaktivierung unabhängig von TLR3 nachwies (150). Dies könnte der Grund für die in dieser Arbeit beobachtete Aktivierung von NK-Zellen sein, jedoch spielen diese für den Erfolg der Poly I:C-Therapie keine Rolle (siehe Abbildung 4.15). Allerdings ist die Beteiligung von MDA5 und TLR3 an der Poly I:C-vermittelten Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen kontrovers. Eine weitere Studie zeigte, dass die Differenzierung von CD8⁺ T-Zellen durch Poly I:C unabhängig von TLR3 ist (150). Eine andere Studie zeigte hingegen, dass während Immunisierungen mit Poly I:C und Ovalbumin beide Rezeptoren für eine Antigen-spezifische CD8⁺ T-Zellantwort benötigt wurden (115). Im Gegensatz dazu beschrieben Wang *et al.*, dass während der Immunisierung mit Poly I:C und Ovalbumin die Gedächtnis CD8⁺ T-Zellantwort durch MDA5 initiiert wurde, die primäre CD8⁺ T-Zellantwort jedoch in Abhängigkeit von TLR3 induziert wurde (197). Die definitive Rolle beider Rezeptoren für die T-Zellantwort nach Poly I:C Stimulation ist zwar unklar, jedoch zeigt die vorliegende Arbeit, dass beide Rezeptoren im Verlauf einer Behandlung einer retroviralen Infektionen mit Poly I:C an der Verstärkung der Immunantwort beteiligt sein können. Frühere Studien unserer Gruppe zeigten bereits, dass die Behandlung von retroviralen Infektionen mit TLR Liganden vielversprechende Resultate liefern. So führte eine Behandlung mit synthetischen Oligodesoxynukleotiden mit CpG-Motiv

(CpG-ODN) während der akuten FV-Infektion zur Reduktion der Viruslast (111). CpG-ODN bindet an den endosomalen TLR9 und führt zur Aktivierung von APC (113, 179) und zur Expression von Zytokinen (z.B. IL-12, TNF α und IFN γ), die zur Initiation einer T_H1-Antwort benötigt werden (2). Die beobachteten Effekte von CpG-ODN während der akuten FV-Infektion wurden durch eine verbesserte CD8⁺ T-Zellantwort vermittelt. Auch in der chronischen FV-Infektion führten T-Zelltransferexperimente zusammen mit einer CpG-ODN-Behandlung zu einer Reduktion der Viruslast, da durch den TLR9 Liganden ein Funktionsverlust dieser transferierten CD8⁺ T-Zellen in der chronischen Infektion verhindert wurde (112). Im Rahmen dieser Arbeit wurden ähnliche therapeutische Effekte durch Poly I:C beobachtet, jedoch induziert CpG-ODN der Klasse B nur sehr geringe Mengen an IFN α , so dass die dort beobachteten Effekte im Gegensatz zu den Resultaten dieser Arbeit vermutlich unabhängig von IFN α waren.

Typ I IFN gehört zu einer Multigenfamilie, die aus 14 verschiedenen *IFN α* Subtyp-Genen und einem *IFN β* -Gen besteht. All diese Subtypen binden an den gleichen Rezeptor, allerdings besitzen sie sehr unterschiedliche biologische Aktivitäten. Daher wurde im letzten Teil dieser Arbeit untersucht, welche IFN α -Subtypen durch die Therapie mit Poly I:C induziert werden und welche antivirale Aktivität die verschiedenen Subtypen aufweisen. Es zeigte sich, dass die Expression des Subtyps 5 besonders stark durch Poly I:C induziert wurde. Dieser besaß jedoch *in vitro* nur eine moderate antiretrovirale Aktivität, darüber hinaus induzierte dieser Subtyp *in vivo* keine antiviralen Effekte gegen das FV (siehe Abbildung 4.27 und Abbildung 4.29). Frühere Arbeiten belegten bereits, dass verschiedene IFN α -Subtypen sehr unterschiedliche biologische Eigenschaften gegen das FV und andere Viren *in vitro* und *in vivo* besitzen. So wurde beschrieben, dass die IFN α -Subtypen 1, 4, 6 und 9 antiretrovirale Aktivität gegen das FV *in vitro* zeigen, *in vivo* wurde eine Inhibition der FV-Replikation jedoch nur nach Behandlung mit den Subtypen IFN α 1, 4 und 6 beobachtet (65). Auch bei anderen Virusinfektionen wurden unterschiedliche antivirale Aktivitäten der verschiedenen IFN α -Subtypen beschrieben. So führte eine IFN-DNA-Vakzinierung mit IFN α 1, 4 und 9 in Mäusen, die mit dem Murinen Cytomegalievirus infiziert wurden, zur Reduktion der Virusreplikation im Muskel während nach DNA-Vakzinierung mit dem Subtyp IFN α 6 die Virusreplikation in allen Organen abnahm (39). Im Rahmen dieser Studie zeigten die Subtypen IFN α 2 und 5 keine antiviralen Effekte, da diese die Virusreplikation in allen untersuchten Organen nicht inhibieren können (39). Im Unterschied dazu wiesen die Subtypen IFN α 5 und 6

bei DNA-Vakzinierungsexperimenten während einer Influenzavirusinfektion *in vivo* die stärksten antiviralen Effekte auf (96). In *in vitro* Studien wurde gezeigt, dass die IFN α -Subtypen 1, 4, 5, 6 und 9 antiviral gegen HSV-1 wirken (76). In weiteren *in vitro* Versuchen wurde die antivirale Eigenschaft, die Mengovirusreplikation zu inhibieren, aller IFN α -Subtypen untersucht. Dabei zeigte sich, dass IFN α 11 und 4 den stärksten antiviralen Effekt hatten (192). Dies korreliert mit den Daten dieser Arbeit, da IFN α 11 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* sehr starke antivirale Effekte gegen das FV aufwies. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen biologischen Aktivitäten der IFN α -Subtypen könnte sein, dass alle Subtypen zwar an den gleichen Rezeptor binden, jedoch sehr unterschiedliche Affinitäten zu ihrem Rezeptor besitzen, wie im humanen System bereits gezeigt wurde (95). Zusätzlich wurde beschrieben, dass es nach Bindung der verschiedenen Subtypen an ihren Rezeptor zur unterschiedlichen Aktivierung von STAT-Molekülen in denselben Zellen kommt (41). Daher wäre es nötig, alle Subtypen auf ihre antivirale Aktivität gegenüber verschiedener Viren zu testen.

Neben den direkten antiviralen Effekten der IFN α Subtypen wurden in dieser Arbeit untersucht, welche immunomodulatorischen Effekte der IFN α Subtyp 11 aufweist. Es wurde nachgewiesen, dass es nach IFN α 11-Behandlung zur Aktivierung von NK- und B-Zellen und zur Expansion von virusspezifischen T-Zellen kam (siehe Abbildung 4.30, Abbildung 4.31 und Abbildung 4.32). Auch IFN α 1, 4 und 9 zeigen eine Aktivierung von NK-Zellen während der akuten FV-Infektion (65), jedoch führte nur die Behandlung mit IFN α 1 zu einer Expansion der virusspezifischen CD8⁺ T-Zellen. So zeigen die verschiedenen IFN α -Subtypen nicht nur unterschiedliche antivirale Eigenschaften, sondern sie besitzen auch diverse immunomodulatorische Eigenschaften, welche offensichtlich abhängig von dem jeweiligen Zelltyp und der Infektion sind. In der klinischen Anwendung wird bisher nur IFN α 2 zur Behandlung von viralen Infektionen wie Hepatitis B und C verwendet. Auch zur Behandlung von Nierenzellkarzinomen, malignen Melanomen und anderen tumorösen Erkrankungen wird IFN α 2 eingesetzt. Die in dieser und anderen Arbeiten gezeigten unterschiedlichen biologischen Effekte der verschiedenen IFN α -Subtypen sollten für eine erfolgversprechende Therapie unterschiedlich eingesetzt werden, so dass in Zukunft neben IFN α 2 andere Subtypen zur optimalen Behandlung von Virusinfektionen oder Tumoren zum Einsatz kommen.

Zusammenfassend zeigte Poly I:C in der Maus einen starken antiretroviralen Effekt und bietet dadurch das Potential zur klinischen Behandlung von retroviralen

Infektionen. Darüber hinaus sollten jedoch neben den direkten antiviralen Effekten einer Therapie die modulatorischen Effekte der eingesetzten Substanzen auf die Zellen des Immunsystems berücksichtigt und genau analysiert werden.

6 Zusammenfassung

Die Expression von Typ I Interferon (IFN) ist in der Regel die erste Antwort des Wirtes auf eine Virusinfektion. Typ I IFN hat eine direkte antivirale Aktivität, welche durch antivirale Enzyme wie Proteinkinase R und Oligoadenylatsynthetase vermittelt wird. Zusätzlich kann Typ I IFN Einfluss auf Zellen des Immunsystems wie z.B. dendritische Zellen, NK-Zellen, T- und B-Zellen, nehmen und deren Funktion modulieren. Viele Viren haben darum verschiedenste Wege gefunden die initiale Produktion von IFN- α/β zu unterdrücken. In retroviralen Infektionen ist die Expression von IFN- α/β sehr schwach, auch wenn der Mechanismus der Suppression der IFN- α -Antwort bisher unbekannt ist. Daher ist eine Möglichkeit der Immuntherapie von Virusinfektionen die Verstärkung der Immunantwort durch die Erhöhung der IFN- α/β -Antwort. Dies kann zum Einen über eine exogene Applikation von rekombinantem Interferon- α geschehen, oder zum Anderen durch die Injektion von Liganden für Toll-ähnliche Rezeptoren (TLR), wie z.B. Poly I:C, das eine starke Expression von Interferon- α induziert. Poly I:C, ein artifizieller Ligand für die zytoplasmatische Helikase MDA5 und den in den Endosomen lokalisierten TLR3, wurde bereits für die Behandlung diverser Virusinfektionen verwendet. Allerdings wurde Poly I:C nicht in retroviralen Infektionen untersucht und vor allem wurde der genaue immunologische Mechanismus, welcher einer erfolgreichen Therapie mit Poly I:C zugrunde liegt, nicht aufgeklärt. In der vorliegenden Arbeit sollte mit Hilfe des Friend Retrovirus-Mausmodell (FV) die Wirkung von Poly I:C in einer antiretroviralen Immuntherapie untersucht werden. Die Behandlung mit Poly I:C in FV-infizierten Mäusen führte zu einer signifikanten Reduktion der Viruslast und verhinderte die Entstehung einer letalen Erythroleukämie. Dieser Effekt von Poly I:C war abhängig von Typ I IFN, denn eine Poly I:C-Therapie in Mäusen, die keinen Interferon- α/β -Rezeptor besitzen, resultierte in keiner Reduktion der Viruslast. Durch die Behandlung mit Poly I:C wurden antivirale Enzyme exprimiert, welche direkt die FV-Replikation inhibierten. Des Weiteren wurde eine Aktivierung und eine verbesserte Effektorfunktion von T-Zellen nach der Therapie mit Poly I:C beobachtet. Die Behandlung induzierte dabei keine Expansion von virus-spezifischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, sondern verbesserte die Effektorfunktion (z.B. Produktion von zytotoxischen Molekülen und Zytokinen) dieser Zellen.

Typ I IFN gehört zu einer Multigenfamilie, die aus 14 verschiedenen *IFN α* Subtyp-Genen und einem *IFN β* -Gen besteht. All diese Subtypen binden an den gleichen

Rezeptor, allerdings besitzen sie sehr unterschiedliche biologische Aktivitäten. Es konnte gezeigt werden, dass Poly I:C *in vivo* die Expression aller IFN α -Subtypen induzierte. Im Weiteren wurden 3 Subtypen (IFN α 2, 5 und 11) auf ihre antivirale Aktivität gegen FV genauer untersucht. IFN α 2 und 5 besaßen *in vivo* keine antiviralen Effekte gegen das FV, obwohl IFN α 5 besonders stark durch Poly I:C induziert wurde. Eine Therapie mit dem Subtyp IFN α 11, welcher allerdings nur sehr moderat durch Poly I:C induziert wurde, reduzierte die Viruslast signifikant und aktivierte NK-, B- und T-Zellen.

Die Ergebnisse zeigen einen direkten antiviralen und immunomodulatorischen Effekt durch die Poly I:C-induzierte IFN α -Antwort und die Therapie mit einem einzelnen Subtyp. Folglich ist der klinische Einsatz von Poly I:C oder einem bestimmten IFN α Subtyp vielversprechend für die Therapie von retroviralen Infektionen.

7 Literaturverzeichnis

1. Aderem A, Underhill DM. 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 17: 593
2. Agrawal S, Kandimalla ER. 2002. Medicinal chemistry and therapeutic potential of CpG DNA. *Trends Mol Med* 8: 114
3. Aichele P, Unsoeld H, Koschella M, Schweier O, Kalinke U, Vucikuja S. 2006. CD8 T cells specific for lymphocytic choriomeningitis virus require type I IFN receptor for clonal expansion. *J Immunol* 176: 4525
4. Akira S, Takeda K. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4: 499
5. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124: 783
6. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413: 732
7. Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, Barouch DH, McHeyzer-Williams MG, et al. 1996. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 274: 94
8. Aman MJ, Tretter T, Eisenbeis I, Bug G, Decker T, et al. 1996. Interferon-alpha stimulates production of interleukin-10 in activated CD4+ T cells and monocytes. *Blood* 87: 4731
9. Angel JB, Greaves W, Long J, Ward D, Rodriguez AE, et al. 2009. Virologic and immunologic activity of PegIntron in HIV disease. *Aids* 23: 2431
10. Ashkar AA, Yao XD, Gill N, Sajic D, Patrick AJ, Rosenthal KL. 2004. Toll-like receptor (TLR)-3, but not TLR4, agonist protects against genital herpes infection in the absence of inflammation seen with CpG DNA. *J Infect Dis* 190: 1841
11. Balian A, Naveau S, Zou W, Durand-Gasselin I, Bouchet L, et al. 2000. Pretreatment expression of the perforin gene by circulating CD8(+) T lymphocytes predicts biochemical response to interferon-alpha in patients with chronic hepatitis C. *Eur Cytokine Netw* 11: 177
12. Baltimore D. 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 226: 1209
13. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, et al. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18: 767
14. Barchet W, Wimmenauer V, Schlee M, Hartmann G. 2008. Accessing the therapeutic potential of immunostimulatory nucleic acids. *Curr Opin Immunol* 20: 389
15. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, et al. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220: 868
16. Berezky S, Lindegren G, Karlberg H, Akerstrom S, Klingstrom J, Mirazimi A. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infection is lethal for adult type I interferon receptor-knockout mice. *J Gen Virol* 91: 1473

17. Beutler B. 2003. Innate immune responses to microbial poisons: discovery and function of the Toll-like receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43: 609
18. Beutler B. 2004. Innate immunity: an overview. *Mol Immunol* 40: 845
19. Biron CA. 1997. Activation and function of natural killer cell responses during viral infections. *Curr Opin Immunol* 9: 24
20. Biron CA, Sonnenfeld G, Welsh RM. 1984. Interferon induces natural killer cell blastogenesis in vivo. *J Leukoc Biol* 35: 31
21. Biron CA, Turgiss LR, Welsh RM. 1983. Increase in NK cell number and turnover rate during acute viral infection. *J Immunol* 131: 1539
22. Black TL, Barber GN, Katze MG. 1993. Degradation of the interferon-induced 68,000-M(r) protein kinase by poliovirus requires RNA. *J Virol* 67: 791
23. Bollati-Fogolin M, Muller W. 2005. Virus free, cell-based assay for the quantification of murine type I interferons. *J Immunol Methods* 306: 169
24. Boyer C, Auphan N, Gabert J, Blanc D, Malissen B, Schmitt-Verhulst AM. 1989. Comparison of phosphorylation and internalization of the antigen receptor/CD3 complex, CD8, and class I MHC-encoded proteins on T cells. Role of intracytoplasmic domains analyzed with hybrid CD8/class I molecules. *J Immunol* 143: 1905
25. Braun D, Caramalho I, Demengeot J. 2002. IFN-alpha/beta enhances BCR-dependent B cell responses. *Int Immunol* 14: 411
26. Brinkmann V, Geiger T, Alkan S, Heusser CH. 1993. Interferon alpha increases the frequency of interferon gamma-producing human CD4+ T cells. *J Exp Med* 178: 1655
27. Brun-Vezinet F, Rouzioux C, Montagnier L, Chamaret S, Gruest J, et al. 1984. Prevalence of antibodies to lymphadenopathy-associated retrovirus in African patients with AIDS. *Science* 226: 453
28. Bukowski JF, Warner JF, Dennert G, Welsh RM. 1985. Adoptive transfer studies demonstrating the antiviral effect of natural killer cells in vivo. *J Exp Med* 161: 40
29. Calvo-Pinilla E, Rodriguez-Calvo T, Anguita J, Sevilla N, Ortego J. 2009. Establishment of a bluetongue virus infection model in mice that are deficient in the alpha/beta interferon receptor. *PLoS One* 4: e5171
30. Chamaillard M, Hashimoto M, Horie Y, Masumoto J, Qiu S, et al. 2003. An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat Immunol* 4: 702
31. Chang HW, Watson JC, Jacobs BL. 1992. The E3L gene of vaccinia virus encodes an inhibitor of the interferon-induced, double-stranded RNA-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 4825
32. Chang MJ, Pourbohloul SC, Yu WD, Furmanski P, Johnson CS. 1992. Differential effect in vitro of tumor necrosis factor-alpha (TNF) on normal and virus-infected erythroid progenitors from Friend virus (FVA)-infected mice. *Exp Hematol* 20: 1271
33. Chen J, Trounstein M, Alt FW, Young F, Kurahara C, et al. 1993. Immunoglobulin gene rearrangement in B cell deficient mice generated by targeted deletion of the JH locus. *Int Immunol* 5: 647

34. Chen W, Qin H, Chesebro B, Cheever MA. 1996. Identification of a gag-encoded cytotoxic T-lymphocyte epitope from FBL-3 leukemia shared by Friend, Moloney, and Rauscher murine leukemia virus-induced tumors. *J Virol* 70: 7773
35. Chesebro B, Miyazawa M, Britt WJ. 1990. Host genetic control of spontaneous and induced immunity to Friend murine retrovirus infection. *Annu Rev Immunol* 8: 477
36. Cobbold SP, Qin SX, Waldmann H. 1990. Reprogramming the immune system for tolerance with monoclonal antibodies. *Semin Immunol* 2: 377
37. Coffin JM HSAVH. 1997. *Retroviruses*
38. Cousens LP, Orange JS, Su HC, Biron CA. 1997. Interferon-alpha/beta inhibition of interleukin 12 and interferon-gamma production in vitro and endogenously during viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 634
39. Cull VS, Bartlett EJ, James CM. 2002. Type I interferon gene therapy protects against cytomegalovirus-induced myocarditis. *Immunology* 106: 428
40. Cull VS, Broomfield S, Bartlett EJ, Brekalo NL, James CM. 2002. Coimmunisation with type I IFN genes enhances protective immunity against cytomegalovirus and myocarditis in gB DNA-vaccinated mice. *Gene Ther* 9: 1369
41. Cull VS, Tilbrook PA, Bartlett EJ, Brekalo NL, James CM. 2003. Type I interferon differential therapy for erythroleukemia: specificity of STAT activation. *Blood* 101: 2727
42. Curtsinger JM, Valenzuela JO, Agarwal P, Lins D, Mescher MF. 2005. Type I IFNs provide a third signal to CD8 T cells to stimulate clonal expansion and differentiation. *J Immunol* 174: 4465
43. D'Andrea AD. 1992. The interaction of the erythropoietin receptor and gp55. *Cancer Surv* 15: 19
44. Darrah PA, Patel DT, De Luca PM, Lindsay RW, Davey DF, et al. 2007. Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*. *Nat Med* 13: 843
45. de Veer MJ, Holko M, Frevel M, Walker E, Der S, et al. 2001. Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. *J Leukoc Biol* 69: 912
46. DeLarco J, Todaro GJ. 1976. Membrane receptors for murine leukemia viruses: characterization using the purified viral envelope glycoprotein, gp71. *Cell* 8: 365
47. DeVita VT, Jr., Broder S, Fauci AS, Kovacs JA, Chabner BA. 1987. Developmental therapeutics and the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med* 106: 568
48. Dittmer U, Hasenkrug KJ. 2001. Cellular and molecular mechanisms of vaccine-induced protection against retroviral infections. *Curr Mol Med* 1: 431
49. Dittmer U, Race B, Hasenkrug KJ. 1999. Kinetics of the development of protective immunity in mice vaccinated with a live attenuated retrovirus. *J Virol* 73: 8435

50. Dittmer U, Race B, Peterson KE, Stromnes IM, Messer RJ, Hasenkrug KJ. 2002. Essential roles for CD8+ T cells and gamma interferon in protection of mice against retrovirus-induced immunosuppression. *J Virol* 76: 450
51. Eisenbarth GS, Kotzin BL. 2003. Enumerating autoreactive T cells in peripheral blood: a big step in diabetes prediction. *J Clin Invest* 111: 179
52. Epperson DE, Arnold D, Spies T, Cresswell P, Pober JS, Johnson DR. 1992. Cytokines increase transporter in antigen processing-1 expression more rapidly than HLA class I expression in endothelial cells. *J Immunol* 149: 3297
53. Feld JJ, Hoofnagle JH. 2005. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature* 436: 967
54. Feldman S, Stein D, Amrute S, Denny T, Garcia Z, et al. 2001. Decreased interferon-alpha production in HIV-infected patients correlates with numerical and functional deficiencies in circulating type 2 dendritic cell precursors. *Clin Immunol* 101: 201
55. Ferran MC, Lucas-Lenard JM. 1997. The vesicular stomatitis virus matrix protein inhibits transcription from the human beta interferon promoter. *J Virol* 71: 371
56. Field AK, Tytell AA, Lampson GP, Hilleman MR. 1967. Inducers of interferon and host resistance. II. Multistranded synthetic polynucleotide complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 58: 1004
57. Figdor CG, van Kooyk Y, Adema GJ. 2002. C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nat Rev Immunol* 2: 77
58. Foster GR, Masri SH, David R, Jones M, Datta A, et al. 2004. IFN-alpha subtypes differentially affect human T cell motility. *J Immunol* 173: 1663
59. Frank MM, Fries LF. 1991. The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunol Today* 12: 322
60. Friend C. 1957. Cell-free transmission in adult Swiss mice of a disease having the character of a leukemia. *J Exp Med* 105: 307
61. Fruh K, Yang Y. 1999. Antigen presentation by MHC class I and its regulation by interferon gamma. *Curr Opin Immunol* 11: 76
62. Gale MJ, Jr., Korth MJ, Katze MG. 1998. Repression of the PKR protein kinase by the hepatitis C virus NS5A protein: a potential mechanism of interferon resistance. *Clin Diagn Virol* 10: 157
63. Garcia-Sastre A, Biron CA. 2006. Type 1 interferons and the virus-host relationship: a lesson in detente. *Science* 312: 879
64. Garcin D, Marq JB, Strahle L, le Mercier P, Kolakofsky D. 2002. All four Sendai Virus C proteins bind Stat1, but only the larger forms also induce its mono-ubiquitination and degradation. *Virology* 295: 256
65. Gerlach N, Gibbert K, Alter C, Nair S, Zelinskyy G, et al. 2009. Anti-retroviral effects of type I IFN subtypes in vivo. *Eur J Immunol* 39: 136
66. Gerlach N, Schimmer S, Weiss U, Kalinke U, Dittmer. 2007. Effects of Type I Interferons on Friend Retrovirus Infection (Erratum). *J Virol* 81: 6160
67. Gerlach N, Schimmer S, Weiss S, Kalinke U, Dittmer U. 2006. Effects of type I interferons on Friend retrovirus infection. *J Virol* 80: 3438

-
68. Ghosh SK, Kusari J, Bandyopadhyay SK, Samanta H, Kumar R, Sen GC. 1991. Cloning, sequencing, and expression of two murine 2'-5'-oligoadenylate synthetases. Structure-function relationships. *J Biol Chem* 266: 15293
69. Gitlin L, Barchet W, Gilfillan S, Cella M, Beutler B, et al. 2006. Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 8459
70. Graf T. 2008. Immunology: blood lines redrawn. *Nature* 452: 702
71. Greaves MF, Brown G. 1973. A human B lymphocyte specific antigen. *Nat New Biol* 246: 116
72. Gregory SH, Wing EJ. 1993. IFN-gamma inhibits the replication of *Listeria monocytogenes* in hepatocytes. *J Immunol* 151: 1401
73. Haas DW, Lavelle J, Nadler JP, Greenberg SB, Frame P, et al. 2000. A randomized trial of interferon alpha therapy for HIV type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 16: 183
74. Halloran PF, Urmson J, Van der Meide PH, Autenried P. 1989. Regulation of MHC expression in vivo. II. IFN-alpha/beta inducers and recombinant IFN-alpha modulate MHC antigen expression in mouse tissues. *J Immunol* 142: 4241
75. Hardy GA, Sieg SF, Rodriguez B, Jiang W, Asaad R, et al. 2009. Desensitization to type I interferon in HIV-1 infection correlates with markers of immune activation and disease progression. *Blood* 113: 5497
76. Harle P, Cull V, Agbaga MP, Silverman R, Williams BR, et al. 2002. Differential effect of murine alpha/beta interferon transgenes on antagonization of herpes simplex virus type 1 replication. *J Virol* 76: 6558
77. Harte MT, Haga IR, Maloney G, Gray P, Reading PC, et al. 2003. The poxvirus protein A52R targets Toll-like receptor signaling complexes to suppress host defense. *J Exp Med* 197: 343
78. Hasenkrug KJ. 1999. Lymphocyte deficiencies increase susceptibility to friend virus-induced erythroleukemia in Fv-2 genetically resistant mice. *J Virol* 73: 6468
79. Hasenkrug KJ, Brooks DM, Chesebro B. 1995. Passive immunotherapy for retroviral disease: influence of major histocompatibility complex type and T-cell responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 10492
80. Hasenkrug KJ, Brooks DM, Robertson MN, Srinivas RV, Chesebro B. 1998. Immunoprotective determinants in friend murine leukemia virus envelope protein. *Virology* 248: 66
81. Hasenkrug KJ, Chesebro B. 1997. Immunity to retroviral infection: the Friend virus model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 7811
82. Hatzakis A, Gargalianos P, Kiosses V, Lazanas M, Sypsa V, et al. 2001. Low-dose IFN-alpha monotherapy in treatment-naïve individuals with HIV-1 infection: evidence of potent suppression of viral replication. *J Interferon Cytokine Res* 21: 861
83. Havenar-Daughton C, Kolumam GA, Murali-Krishna K. 2006. Cutting Edge: The direct action of type I IFN on CD4 T cells is critical for sustaining clonal expansion in response to a viral but not a bacterial infection. *J Immunol* 176: 3315

84. He H, Messer RJ, Sakaguchi S, Yang G, Robertson SJ, Hasenkrug KJ. 2004. Reduction of retrovirus-induced immunosuppression by in vivo modulation of T cells during acute infection. *J Virol* 78: 11641
85. Heinz S, Haehnel V, Karaghiosoff M, Schwarzfischer L, Muller M, et al. 2003. Species-specific regulation of Toll-like receptor 3 genes in men and mice. *J Biol Chem* 278: 21502
86. Heng JK, Price P, Lai CM, Beilharz MW. 1996. Alpha/beta interferons increase host resistance to murine AIDS. *J Virol* 70: 4517
87. Herbst-Kralovetz MM, Pyles RB. 2006. Quantification of poly(I:C)-mediated protection against genital herpes simplex virus type 2 infection. *J Virol* 80: 9988
88. Heusel JW, Wesselschmidt RL, Shresta S, Russell JH, Ley TJ. 1994. Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. *Cell* 76: 977
89. Hoatlin ME, Kabat D. 1995. Host-range control of a retroviral disease: Friend erythroleukemia. *Trends Microbiol* 3: 51
90. Honda K, Sakaguchi S, Nakajima C, Watanabe A, Yanai H, et al. 2003. Selective contribution of IFN-alpha/beta signaling to the maturation of dendritic cells induced by double-stranded RNA or viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 10872
91. Honda K, Yanai H, Negishi H, Asagiri M, Sato M, et al. 2005. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* 434: 772
92. Hsu YM, Zhang Y, You Y, Wang D, Li H, et al. 2007. The adaptor protein CARD9 is required for innate immune responses to intracellular pathogens. *Nat Immunol* 8: 198
93. Imani F, Jacobs BL. 1988. Inhibitory activity for the interferon-induced protein kinase is associated with the reovirus serotype 1 sigma 3 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 7887
94. Iwanami N, Niwa A, Yasutomi Y, Tabata N, Miyazawa M. 2001. Role of natural killer cells in resistance against friend retrovirus-induced leukemia. *J Virol* 75: 3152
95. Jaks E, Gavutis M, Uze G, Martal J, Piehler J. 2007. Differential receptor subunit affinities of type I interferons govern differential signal activation. *J Mol Biol* 366: 525
96. James CM, Abdad MY, Mansfield JP, Jacobsen HK, Vind AR, et al. 2007. Differential activities of alpha/beta IFN subtypes against influenza virus in vivo and enhancement of specific immune responses in DNA vaccinated mice expressing haemagglutinin and nucleoprotein. *Vaccine* 25: 1856
97. Janeway. 2002. *Immunologie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag. 777 pp.
98. Jaworska J, Gravel A, Fink K, Grandvaux N, Flamand L. 2007. Inhibition of transcription of the beta interferon gene by the human herpesvirus 6 immediate-early 1 protein. *J Virol* 81: 5737
99. Kabat D. 1989. Molecular biology of Friend viral erythroleukemia. *Curr Top Microbiol Immunol* 148: 1

100. Kamga I, Kahi S, Develioglu L, Lichtner M, Maranon C, et al. 2005. Type I interferon production is profoundly and transiently impaired in primary HIV-1 infection. *J Infect Dis* 192: 303
101. Kastner P, Chan S. 2008. PU.1: a crucial and versatile player in hematopoiesis and leukemia. *Int J Biochem Cell Biol* 40: 22
102. Kato H, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, et al. 2006. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 441: 101
103. Kawai T, Akira S. 2007. Antiviral signaling through pattern recognition receptors. *J Biochem* 141: 137
104. Kawai T, Takahashi K, Sato S, Coban C, Kumar H, et al. 2005. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol* 6: 981
105. Khatissian E, Tovey MG, Cumont MC, Monceaux V, Lebon P, et al. 1996. The relationship between the interferon alpha response and viral burden in primary SIV infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 12: 1273
106. Kitajewski J, Schneider RJ, Safer B, Munemitsu SM, Samuel CE, et al. 1986. Adenovirus VAI RNA antagonizes the antiviral action of interferon by preventing activation of the interferon-induced eIF-2 alpha kinase. *Cell* 45: 195
107. Kolumam GA, Thomas S, Thompson LJ, Sprent J, Murali-Krishna K. 2005. Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection. *J Exp Med* 202: 637
108. Konig R, Huang LY, Germain RN. 1992. MHC class II interaction with CD4 mediated by a region analogous to the MHC class I binding site for CD8. *Nature* 356: 796
109. Koo GC, Peppard JR. 1984. Establishment of monoclonal anti-Nk-1.1 antibody. *Hybridoma* 3: 301
110. Kovacs JA, Bechtel C, Davey RT, Jr., Falloon J, Polis MA, et al. 1996. Combination therapy with didanosine and interferon-alpha in human immunodeficiency virus-infected patients: results of a phase I/II trial. *J Infect Dis* 173: 840
111. Kraft AR, Arndt T, Hasenkrug KJ, Dittmer U. 2005. Effective treatment of retrovirus-induced suppression of antibody responses with CpG oligodeoxynucleotides. *J Gen Virol* 86: 3365
112. Kraft AR, Krux F, Schimmer S, Ohlen C, Greenberg PD, Dittmer U. 2007. CpG oligodeoxynucleotides allow for effective adoptive T-cell therapy in chronic retroviral infection. *Blood* 109: 2982
113. Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, et al. 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374: 546
114. Krown SE, Real FX, Cunningham-Rundles S, Myskowski PL, Koziner B, et al. 1983. Preliminary observations on the effect of recombinant leukocyte A interferon in homosexual men with Kaposi's sarcoma. *N Engl J Med* 308: 1071
115. Kumar H, Koyama S, Ishii KJ, Kawai T, Akira S. 2008. Cutting edge: cooperation of IPS-1- and TRIF-dependent pathways in poly IC-enhanced antibody production and cytotoxic T cell responses. *J Immunol* 180: 683

116. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, et al. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860
117. Lander MR, Chattopadhyay SK. 1984. A Mus dunni cell line that lacks sequences closely related to endogenous murine leukemia viruses and can be infected by ectropic, amphotropic, xenotropic, and mink cell focus-forming viruses. *J Virol* 52: 695
118. Lane HC, Davey V, Kovacs JA, Feinberg J, Metcalf JA, et al. 1990. Interferon-alpha in patients with asymptomatic human immunodeficiency virus (HIV) infection. A randomized, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 112: 805
119. Le Bon A, Etchart N, Rossmann C, Ashton M, Hou S, et al. 2003. Cross-priming of CD8+ T cells stimulated by virus-induced type I interferon. *Nat Immunol* 4: 1009
120. Le Bon A, Tough DF. 2008. Type I interferon as a stimulus for cross-priming. *Cytokine Growth Factor Rev* 19: 33
121. Leonard GT, Sen GC. 1996. Effects of adenovirus E1A protein on interferon-signaling. *Virology* 224: 25
122. Levy JA, Hoffman AD, Kramer SM, Landis JA, Shimabukuro JM, Oshiro LS. 1984. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* 225: 840
123. Li XD, Sun L, Seth RB, Pineda G, Chen ZJ. 2005. Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 17717
124. Lin R, Noyce RS, Collins SE, Everett RD, Mossman KL. 2004. The herpes simplex virus ICP0 RING finger domain inhibits IRF3- and IRF7-mediated activation of interferon-stimulated genes. *J Virol* 78: 1675
125. Lobigs M, Mullbacher A, Wang Y, Pavy M, Lee E. 2003. Role of type I and type II interferon responses in recovery from infection with an encephalitic flavivirus. *J Gen Virol* 84: 567
126. Mahalingam S, Karupiah G. 1999. Chemokines and chemokine receptors in infectious diseases. *Immunol Cell Biol* 77: 469
127. Malmgaard L, Melchjorsen J, Bowie AG, Mogensen SC, Paludan SR. 2004. Viral activation of macrophages through TLR-dependent and -independent pathways. *J Immunol* 173: 6890
128. Marques R, Antunes I, Eksmond U, Stoye J, Hasenkrug K, Kassiotis G. 2008. B lymphocyte activation by coinfection prevents immune control of friend virus infection. *J Immunol* 181: 3432
129. Matsumoto M, Funami K, Oshiumi H, Seya T. 2004. Toll-like receptor 3: a link between toll-like receptor, interferon and viruses. *Microbiol Immunol* 48: 147
130. McCartney S, Vermi W, Gilfillan S, Cella M, Murphy TL, et al. 2009. Distinct and complementary functions of MDA5 and TLR3 in poly(I:C)-mediated activation of mouse NK cells. *J Exp Med* 206: 2967
131. Messer RJ, Dittmer U, Peterson KE, Hasenkrug KJ. 2004. Essential role for virus-neutralizing antibodies in sterilizing immunity against Friend retrovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 12260

132. Meurs E, Chong K, Galabru J, Thomas NS, Kerr IM, et al. 1990. Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon. *Cell* 62: 379
133. Michallet MC, Meylan E, Ermolaeva MA, Vazquez J, Rebsamen M, et al. 2008. TRADD protein is an essential component of the RIG-like helicase antiviral pathway. *Immunity* 28: 651
134. Miller DM, Rahill BM, Boss JM, Lairmore MD, Durbin JE, et al. 1998. Human cytomegalovirus inhibits major histocompatibility complex class II expression by disruption of the Jak/Stat pathway. *J Exp Med* 187: 675
135. Miller SA, Brown AJ, Farach-Carson MC, Kirn-Safran CB. 2003. HIP/RPL29 down-regulation accompanies terminal chondrocyte differentiation. *Differentiation* 71: 322
136. Minami Y, Samelson LE, Klausner RD. 1987. Internalization and cycling of the T cell antigen receptor. Role of protein kinase C. *J Biol Chem* 262: 13342
137. Miyazawa M, Nishio J, Chesebro B. 1988. Genetic control of T cell responsiveness to the Friend murine leukemia virus envelope antigen. Identification of class II loci of the H-2 as immune response genes. *J Exp Med* 168: 1587
138. Miyazawa M, Nishio J, Chesebro B. 1992. Protection against Friend retrovirus-induced leukemia by recombinant vaccinia viruses expressing the gag gene. *J Virol* 66: 4497
139. Moreau-Gachelin F. 2008. Multi-stage Friend murine erythroleukemia: molecular insights into oncogenic cooperation. *Retrovirology* 5: 99
140. Moreau-Gachelin F, Tavitian A, Tambourin P. 1988. Spi-1 is a putative oncogene in virally induced murine erythroleukaemias. *Nature* 331: 277
141. Mori S, Jewett A, Cavalcanti M, Murakami-Mori K, Nakamura S, Bonavida B. 1998. Differential regulation of human NK cell-associated gene expression following activation by IL-2, IFN-alpha and PMA/ionomycin. *Int J Oncol* 12: 1165
142. Mosmann TR, Coffman RL. 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7: 145
143. Müller U, P. Vogel, G. Alber and G. A. Schaub. 2008. The innate immune system of mammals and insects. *Contribution in Microbiology* 15: 21
144. Mullbacher A, Lobigs M, Hla RT, Tran T, Stehle T, Simon MM. 2002. Antigen-dependent release of IFN-gamma by cytotoxic T cells up-regulates Fas on target cells and facilitates exocytosis-independent specific target cell lysis. *J Immunol* 169: 145
145. Muller U, Steinhoff U, Reis LF, Hemmi S, Pavlovic J, et al. 1994. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* 264: 1918
146. Nagata S. 1996. Fas-mediated apoptosis. *Adv Exp Med Biol* 406: 119
147. Nair SR, Zelinskyy G, Schimmer S, Gerlach N, Kassiotis G, Dittmer U. 2009. Mechanisms of control of acute Friend virus infection by CD4+ helper T cells and their functional impairment by regulatory T cells. *J Gen Virol*

148. Nazli A, Yao XD, Smieja M, Rosenthal KL, Ashkar AA, Kaushic C. 2009. Differential induction of innate anti-viral responses by TLR ligands against Herpes simplex virus, type 2, infection in primary genital epithelium of women. *Antiviral Res* 81: 103
149. Neumann AU, Lam NP, Dahari H, Gretch DR, Wiley TE, et al. 1998. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science* 282: 103
150. Ngoi SM, Tovey MG, Vella AT. 2008. Targeting poly(I:C) to the TLR3-independent pathway boosts effector CD8 T cell differentiation through IFN-alpha/beta. *J Immunol* 181: 7670
151. Nisole S, Stoye JP, Saib A. 2005. TRIM family proteins: retroviral restriction and antiviral defence. *Nat Rev Microbiol* 3: 799
152. Novembre FJ, de Rosayro J, Nidtha S, O'Neil SP, Gibson TR, et al. 2001. Rapid CD4(+) T-cell loss induced by human immunodeficiency virus type 1(NC) in uninfected and previously infected chimpanzees. *J Virol* 75: 1533
153. O'Neil SP, Novembre FJ, Hill AB, Suwyn C, Hart CE, et al. 2000. Progressive infection in a subset of HIV-1-positive chimpanzees. *J Infect Dis* 182: 1051
154. Parnes JR. 1989. Molecular biology and function of CD4 and CD8. *Adv Immunol* 44: 265
155. Parronchi P, De Carli M, Manetti R, Simonelli C, Sampognaro S, et al. 1992. IL-4 and IFN (alpha and gamma) exert opposite regulatory effects on the development of cytolytic potential by Th1 or Th2 human T cell clones. *J Immunol* 149: 2977
156. Pear WS, Nolan GP, Scott ML, Baltimore D. 1993. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 8392
157. Peterson KE, Iwashiro M, Hasenkrug KJ, Chesebro B. 2000. Major histocompatibility complex class I gene controls the generation of gamma interferon-producing CD4(+) and CD8(+) T cells important for recovery from friend retrovirus-induced leukemia. *J Virol* 74: 5363
158. Platanias LC. 2005. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol* 5: 375
159. Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, Gallo RC. 1984. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* 224: 497
160. Poppers J, Mulvey M, Khoo D, Mohr I. 2000. Inhibition of PKR activation by the proline-rich RNA binding domain of the herpes simplex virus type 1 Us11 protein. *J Virol* 74: 11215
161. Portnoy DA, Schreiber RD, Connelly P, Tilney LG. 1989. Gamma interferon limits access of *Listeria monocytogenes* to the macrophage cytoplasm. *J Exp Med* 170: 2141
162. Price DA, Klenerman P, Booth BL, Phillips RE, Sewell AK. 1999. Cytotoxic T lymphocytes, chemokines and antiviral immunity. *Immunol Today* 20: 212
163. Raaben M, Groot Koerkamp MJ, Rottier PJ, de Haan CA. 2009. Type I interferon receptor-independent and -dependent host transcriptional

- responses to mouse hepatitis coronavirus infection in vivo. *BMC Genomics* 10: 350
164. Rakenius A. 2005. *The activation-specific blockade of GPIIb/IIIa on platelets with single-chain antibodies and peptides*. Inaugural-Dissertation thesis. Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Freiburg
 165. Robertson MN, Spangrude GJ, Hasenkrug K, Perry L, Nishio J, et al. 1992. Role and specificity of T-cell subsets in spontaneous recovery from Friend virus-induced leukemia in mice. *J Virol* 66: 3271
 166. Rogers KM, Deatheridge M, Breshears MA, Chapman S, Black D, et al. 2009. Type I IFN response to Papiine herpesvirus 2 (Herpesvirus papio 2; HVP2) determines neuropathogenicity in mice. *Virology* 386: 280
 167. Salazar-Mather TP, Ishikawa R, Biron CA. 1996. NK cell trafficking and cytokine expression in splenic compartments after IFN induction and viral infection. *J Immunol* 157: 3054
 168. Salem ML, El-Naggar SA, Kadima A, Gillanders WE, Cole DJ. 2006. The adjuvant effects of the toll-like receptor 3 ligand polyinosinic-cytidylic acid poly (I:C) on antigen-specific CD8+ T cell responses are partially dependent on NK cells with the induction of a beneficial cytokine milieu. *Vaccine* 24: 5119
 169. Schandene L, Cogan E, Crusiaux A, Goldman M. 1997. Interferon-alpha upregulates both interleukin-10 and interferon-gamma production by human CD4+ T cells. *Blood* 89: 1110
 170. Schepers K, Toebes M, Sotthwes G, Vyth-Dreese FA, DelleMijn TA, et al. 2002. Differential kinetics of antigen-specific CD4+ and CD8+ T cell responses in the regression of retrovirus-induced sarcomas. *J Immunol* 169: 3191
 171. Schulz O, Diebold SS, Chen M, Naslund TI, Nolte MA, et al. 2005. Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. *Nature* 433: 887
 172. Scott P, Trinchieri G. 1995. The role of natural killer cells in host-parasite interactions. *Curr Opin Immunol* 7: 34
 173. Seder RA, Darrah PA, Roederer M. 2008. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nat Rev Immunol* 8: 247
 174. Seder RA, Paul WE. 1994. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu Rev Immunol* 12: 635
 175. Shein HM, Enders JF. 1962. Transformation induced by simian virus 40 in human renal cell cultures. I. Morphology and growth characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 48: 1164
 176. Shimizu T, Uenishi H, Teramura Y, Iwashiro M, Kuribayashi K, et al. 1994. Fine structure of a virus-encoded helper T-cell epitope expressed on FBL-3 tumor cells. *J Virol* 68: 7704
 177. Skidmore SJ, Mawson SJ. 1987. alpha-Interferon in anti-HIV positive patients. *Lancet* 2: 520
 178. Sommereyns C, Paul S, Staeheli P, Michiels T. 2008. IFN-lambda (IFN-lambda) is expressed in a tissue-dependent fashion and primarily acts on epithelial cells in vivo. *PLoS Pathog* 4: e1000017
 179. Stacey KJ, Sweet MJ, Hume DA. 1996. Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA. *J Immunol* 157: 2116

180. Stalder T, Hahn S, Erb P. 1994. Fas antigen is the major target molecule for CD4+ T cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 152: 1127
181. Steinman RM, Hemmi H. 2006. Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* 311: 17
182. Stevens TL, Bossie A, Sanders VM, Fernandez-Botran R, Coffman RL, et al. 1988. Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. *Nature* 334: 255
183. Stoye JP. 1998. Fv1, the mouse retrovirus resistance gene. *Rev Sci Tech* 17: 269
184. Stromnes IM, Dittmer U, Schumacher TN, Schepers K, Messer RJ, et al. 2002. Temporal effects of gamma interferon deficiency on the course of Friend retrovirus infection in mice. *J Virol* 76: 2225
185. Takaoka A, Yanai H, Kondo S, Duncan G, Negishi H, et al. 2005. Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* 434: 243
186. Telerman A, Amson RB, Romasco F, Wybran J, Galand P, Mosselmans R. 1987. Internalization of human T lymphocyte receptors. *Eur J Immunol* 17: 991
187. Temin HM, Mizutani S. 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 226: 1211
188. Tough DF. 2004. Type I interferon as a link between innate and adaptive immunity through dendritic cell stimulation. *Leuk Lymphoma* 45: 257
189. Trapp S, Derby NR, Singer R, Shaw A, Williams VG, et al. 2009. Double-stranded RNA analog poly(I:C) inhibits human immunodeficiency virus amplification in dendritic cells via type I interferon-mediated activation of APOBEC3G. *J Virol* 83: 884
190. Trinchieri G, Santoli D, Granato D, Perussia B. 1981. Antagonistic effects of interferons on the cytotoxicity mediated by natural killer cells. *Fed Proc* 40: 2705
191. UNAIDS. 2008. AIDS epidemic update : December 2007.
192. van Pesch V, Lanaya H, Renauld JC, Michiels T. 2004. Characterization of the murine alpha interferon gene family. *J Virol* 78: 8219
193. Villadangos JA, Schnorrer P. 2007. Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nat Rev Immunol* 7: 543
194. Volberding P, Valero R, Rothman J, Gee G. 1984. Alpha interferon therapy of Kaposi's sarcoma in AIDS. *Ann N Y Acad Sci* 437: 439
195. Wallach D, Varfolomeev EE, Malinin NL, Goltsev YV, Kovalenko AV, Boldin MP. 1999. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol* 17: 331
196. Walzer T, Dalod M, Robbins SH, Zitvogel L, Vivier E. 2005. Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". *Blood* 106: 2252
197. Wang Y, Cella M, Gilfillan S, Colonna M. Cutting edge: polyinosinic:polycytidylic acid boosts the generation of memory CD8 T cells through melanoma differentiation-associated protein 5 expressed in stromal cells. *J Immunol* 184: 2751

198. Werts C, Tapping RI, Mathison JC, Chuang TH, Kravchenko V, et al. 2001. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat Immunol* 2: 346
199. Wills RJ. 1990. Clinical pharmacokinetics of interferons. *Clin Pharmacokinet* 19: 390
200. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, et al. 2003. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301: 640
201. Zelinskyy G. 2004. *Untersuchungen zur Rolle von zytotoxischen Molekülen bei der Immunabwehr gegen Retroviren*. Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
202. Zelinskyy G, Balkow S, Schimmer S, Schepers K, Simon MM, Dittmer U. 2004. Independent roles of perforin, granzymes, and Fas in the control of Friend retrovirus infection. *Virology* 330: 365
203. Zelinskyy G, Balkow S, Schimmer S, Werner T, Simon MM, Dittmer U. 2007. The level of friend retrovirus replication determines the cytolytic pathway of CD8+ T-cell-mediated pathogen control. *J Virol* 81: 11881
204. Zhang X, Sun S, Hwang I, Tough DF, Sprent J. 1998. Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8+ T cells in vivo by IL-15. *Immunity* 8: 591
205. Zhou A, Hassel BA, Silverman RH. 1993. Expression cloning of 2-5A-dependent RNAase: a uniquely regulated mediator of interferon action. *Cell* 72: 753
206. Zinkernagel RM, Doherty PC. 1974. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* 248: 701

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

7AAD 7-Aminoactinomycin D

A

AdV Adenovirus

AF Alexa Fluor

AIDS erworbenes Immundefektsyndrom (*Acquired Immune Deficiency Syndrome*)

AK Antikörper

APC Antigen-präsentierende Zelle

APC Allophycocyanin

B

bp Basenpaare

BFA Brefeldin A

BSA Rinderserumalbumin

bzw. beziehungsweise

C

C Celsius

ca. circa

CD Nomenklatur für Zelloberflächenmoleküle (*Cluster of differentiation*)

CFSE *Carboxyfluorescein succinimidyl ester*

cDNA *complementary DNA*

CTL Zytotoxische T-Lymphozyten

D

DC Dendritische Zelle

d.h. das heißt

DMSO Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpi	Tage nach Infektion (<i>days post infection</i>)
ds	doppelsträngig
E	
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
env	Virushülle (<i>envelope</i>)
eIF2 α	eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor 2 α
EMCV	Enzephalomyocarditis Virus
EPO-R	Erythropoietinrezeptor
F	
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FADD	<i>Fas-associated protein with death domain</i>
FCS	Fötales Kälberserum
FFU	<i>Focus forming units</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
F-MuLV	Friend Murines Leukämievirus
FSC	Vorwärtsstreulicht (<i>forward scatter</i>)
FV	Friend Retrovirus
G	
g	Gravitation, Erdbeschleunigung
g	Gramm
<i>gag</i>	Gruppenspezifische Antigene
GAS	IFN γ -aktivierte Stelle
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
gp	Glykoprotein
Gzm	Granzym
H	
h	Stunde
HCV	Hepatitis C Virus

HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HRP	Meerretichperoxidase (<i>horse radish peroxidase</i>)
HSV	Herpes Simplex Virus
I	
IC	<i>infectious center</i>
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IFN	Interferon
IFNAR	Interferon- α/β -Rezeptor
i.p.	intraperitoneal
IPS	<i>IFNβ promotor stimulator protein</i>
IRF	<i>Interferon regulatory factor</i>
ISG	Interferon-stimulierte Gene
ISRE	IFN-stimuliertes Antwortelement
i.v.	intravenös
K	
kb	Kilobase
L	
LCMV	Lymphozytäres Choriomeningitis-Virus
LDV	<i>Lactate dehydrogenase-elevating virus</i>
LGP2	<i>laboratory of genetics and physiology-2</i>
LTR	<i>Long terminal repeats</i>
M	
μ	mikro
m	milli
M	Molar
MACS	<i>Magnetic cell sorting</i>
MDA5	<i>melanoma differentiation-associated gene 5</i>
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität (<i>Mean fluorescence intensity</i>)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minuten

MIP-1 α,β	<i>Macrophage Inflammatory Protein-1</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MuLV	<i>Murines Leukämievirus</i>
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
N	
n	nano
NALP	<i>NACHT-LRR-PYD-containing protein</i>
NDV	Newcastle-Disease-Virus
NF κ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NLR	NOD-ähnliche Rezeptoren
NOD	<i>nucleotide binding oligomerization domain</i>
O	
OAS	Oligoadenylatsynthetase
ODN	Oligodesoxynukleotide
P	
P	Phosphorylierung
PAMPs	pathogenassoziierte molekulare Muster (<i>pathogen associated molecular pattern</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PerCP	<i>Peridinin-chlorophyll-protein complex</i>
pH	negative dekadischer Logarithmus der Oxoniumionenkonzentration (lat. <i>potentia Hydrogenii</i>)
PI	Propidiumjodid
pit-1/2	<i>inorganic phospate transporter</i>
PKR	Proteinkinase R
<i>pol</i>	Polymerase
<i>pro</i>	Protease
PRR	Mustererkennende Rezeptoren (<i>pattern recognition receptors</i>)

R

RANTES	<i>Regulated on Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted</i>
RIG-I	<i>retinoic acid-inducible gene I</i>
RIP	<i>Receptor-interacting protein</i>
RLH	RIG-I ähnliche Helikasen
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Echtzeit (<i>Real Time</i>)
RT	Reverse Transkriptase

S

SeV	Sendaivirus
SFFU	<i>spleen focus forming units</i>
SFFV	<i>spleen focus forming virus</i>
SIV	Simianes Immundefizienzvirus
ss	einzelsträngig
SSC	Seitwärtsstreulicht (<i>sideward scatter</i>)
SPF	speziell pathogenfrei
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>

T

TCR	T-Zell-Rezeptor
Th-Zelle	T-Helfer-Zelle
TLR	Toll-ähnliche Rezeptoren
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRIF	<i>Toll-Interleukin-1-resistance (TIR) domain-containing adaptor inducing IFNβ</i>

U

Ub	Ubiquitinierung
----	-----------------

V

VACV	Vacciniavirus
VSV	Vesikuläres Stomatitis Virus

W

wpi

Wochen nach Infektion (*weeks post infection*)

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 TLR3 Signalweg ; verändert nach (103)	5
Abbildung 1.2 RLH-Signalwege (103)	6
Abbildung 1.3 Typ I IFN Signalkaskade (verändert nach (158))	8
Abbildung 1.4 Diverse Strategien der Immunevasion von Viren	10
Abbildung 1.5 Aufbau eines einfachen und komplexen retroviralen Genoms am Beispiel von MuLV und HIV	15
Abbildung 1.6 Struktureller Aufbau von Retroviren (37)	16
Abbildung 1.7 Replikationszyklus von Retroviren (verändert nach (151)).....	18
Abbildung 1.8 Einteilung der unterschiedlichen Stadien der Milzgröße nach FV-Infektion (verändert nach (80))	23
Abbildung 2.1 Schematische Darstellung des verwendeten Plasmids und der enthaltenden Sequenzen der IFN α -Subtypen-Gen.....	36
Abbildung 3.1 Funktionsweise eines Durchflusszytometers (verändert nach (164)).	47
Abbildung 3.2 Aufbau eines MHC Klasse I Tetramers (verändert nach (51))	50
Abbildung 4.1 IFN α -Konzentration im Plasma von FV-infizierten Mäusen nach Poly I:C-Gabe	60
Abbildung 4.2 Versuchsablauf der Poly I:C-Behandlung in der akuten FV-Infektion	60
Abbildung 4.3 Milzgewichte und Viruslast nach Poly I:C-Therapie in der akuten FV-Infektion.....	61
Abbildung 4.4 Poly I:C-Therapie in IFN α Rezeptor-Knockout-Mäusen.....	63
Abbildung 4.5 Versuchsablauf der Langzeitstudie nach Poly I:C-Therapie	64
Abbildung 4.6 Langzeitbeobachtung der Poly I:C-Behandlung	65
Abbildung 4.7 Auswirkung der Poly I:C-Behandlung auf eine Leukämieentstehung	66
Abbildung 4.8 Versuchsablauf der Poly I:C-Behandlung in der chronischen FV-Infektion	67
Abbildung 4.9 Poly I:C-Therapie in der chronischen FV-Infektion	67
Abbildung 4.10 Direkte antivirale Effekte von Poly I:C und die Expression von OAS1a und PKR mRNA	69
Abbildung 4.11 Untersuchung der Aktivierung von B-Zellen nach Poly I:C-Behandlung.....	71
Abbildung 4.12 Poly I:C-Behandlung in der akuten FV-Infektion in B-Zell-defizienten Mäusen	72
Abbildung 4.13 Untersuchung der Aktivierung von NK-Zellen nach	

Poly I:C-Behandlung.....	74
Abbildung 4.14 Versuchsablauf der Lymphozytendepletion während der Poly I:C-Behandlung.....	75
Abbildung 4.15 Depletion von Lymphozyten während Poly I:C-Therapie in der akuten FV-Infektion.....	77
Abbildung 4.16 Untersuchung von FV-spezifischen CD4 ⁺ T-Zellen nach Poly I:C-Behandlung.....	78
Abbildung 4.17 Untersuchung der Aktivierung von CD4 ⁺ T-Zellen nach Poly I:C-Behandlung.....	79
Abbildung 4.18 Untersuchung von Effektor-CD4 ⁺ T-Zellen nach Poly I:C-Behandlung.....	81
Abbildung 4.19 Untersuchung multifunktioneller CD4 ⁺ T-Zellen nach Poly I:C-Behandlung.....	82
Abbildung 4.20 Untersuchung von FV-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen nach Poly I:C-Behandlung.....	83
Abbildung 4.21 Untersuchung von Effektor-CD8 ⁺ T-Zellen nach Poly I:C-Behandlung.....	85
Abbildung 4.22 <i>In vivo</i> Zytotoxizität von CD8 ⁺ T-Zellen.....	86
Abbildung 4.23 Poly I:C-Therapie in der akuten FV-Infektion in GzmB ^{-/-} Mäusen	88
Abbildung 4.24 Expression von Chemokinen in der Milz 24 h nach Poly I:C-Injektion in der akuten FV-Infektion.....	90
Abbildung 4.25 Poly I:C-Behandlung in der akuten FV-Infektion in TLR2 ^{-/-} TLR3 ^{-/-} -Mäusen und MDA5 ^{-/-} -Mäusen.....	93
Abbildung 4.26 Expression von verschiedenen IFNα-Subtypen nach Poly I:C-Injektion.....	95
Abbildung 4.27 Antivirale Effekte von diversen IFNα-Subtypen <i>in vitro</i>	97
Abbildung 4.28 Versuchsablauf der IFNα-Subtypen-Behandlung in der akuten FV-Infektion	98
Abbildung 4.29 Antivirale Effekte von diversen IFNα-Subtypen	99
Abbildung 4.30 Untersuchung der Aktivierung von B-Zellen nach IFNα11-Behandlung.....	101
Abbildung 4.31 Untersuchung der Aktivierung von NK-Zellen nach IFNα11-Behandlung.....	102
Abbildung 4.32 Untersuchung der Aktivierung von CD4 ⁺ T-Zellen nach IFNα11-Therapie.....	103

Abbildung 4.33 Absolute Anzahl von FV-spezifischen CD4 ⁺ T-Zellen nach IFNα11-Therapie.....	104
Abbildung 4.34 Untersuchung der Effektorfunktion von CD8 ⁺ T-Zellen nach IFNα11-Therapie.....	105
Abbildung 4.35 Untersuchung von FV-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen nach IFNα11-Therapie.....	106

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1 Die TLR und ihre Liganden	3
Tabelle 2.1 Verwendete Geräte.....	26
Tabelle 2.2 Verwendete Materialien	27
Tabelle 2.3 Puffer und Medien.....	29
Tabelle 2.4 Verwendete Antikörper	31
Tabelle 2.5 Charakterisierung der Fluorochrome	32
Tabelle 2.6 Verwendete Standardtests.....	33
Tabelle 2.7 Verwendete Zelllinien.....	34
Tabelle 2.8 Verwendete Oligonukleotide und Sonden.....	35
Tabelle 2.9 Verwendet Primer von Qiagen	35
Tabelle 2.10 Eigenschaften der verwendeten Plasmide.....	36

8.4 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Ulf Dittmer für die gute Betreuung meiner Arbeit bedanken. Die vielen hilfreichen Unterstützungen und anregenden Diskussionen seinerseits haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Besonders bedanken will ich mich auch für die Freiheit, die er mir während des gesamten Forschungsprojektes gewährte. Sein kompetenter Rat und seine Hilfe kamen mir in zahlreichen Angelegenheiten sehr zugute.

Ich danke Prof. Dr. Roggendorf für die Möglichkeit in seinem Institut meine Arbeiten durchzuführen.

Besonderer Dank gilt den Mitgliedern des Graduiertenkollegs 1045, die mich 3 Jahre lang in wissenschaftlichen Angelegenheiten begleitet haben. Vielen Dank für die Unterstützung, die Diskussionen und für die vielfältigen Anregungen.

Ich möchte mich zudem bei der Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit bedanken.

Ein ganz herzliches Dankeschön geht an meine Arbeitsgruppe für die tollen 3 Jahre. Vielen Dank für alle praktischen und moralischen Tipps und Unterstützungen im Laboralltag und natürlich auch die netten Diskussionen in der Kaffeepause. Ganz besonders möchte ich mich bei Kirsten bedanken, die während dieser 3 Jahre immer zu mir gehalten und ein offenes Ohr für mich hatte. Ansonsten möchte ich mich noch bei allen neuen und alten Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe (Simone, Tanja, Gennadiy, Daniela, Savita, Ilseyar, Sandra, Wibke, Nora, Jara, Volker, Sonja und Philipp) für die gemeinsam verbrachten Labortage bedanken.

Ein besonderer Dank geht an meine Mitdoktoranden (besonders Simone, Marina, Marianne, Milena und Susanne) sowie alle Mitarbeiter des Instituts für Virologie für die außerordentlich gute Zusammenarbeit.

Insbesondere möchte ich auf diesem offiziellen Weg meinen Eltern, denen diese Doktorarbeit gewidmet ist, danken. Sie haben mir diese Universitätsausbildung ermöglicht, mir jederzeit und in jeder Hinsicht zur Seite gestanden.

Ich danke auch ganz besonders den Menschen (Lena, Nina, Anna, Anna, mein Bruder Markus), die mir außerhalb des Instituts die nötige seelisch-moralische Unterstützung gegeben haben, und mir die Zeit in Essen sehr angenehm bereitet haben.

Zuletzt möchte ich meinem Freund Martin für die Unterstützung während der letzten 2 Jahre danken. Er war in jeder Gelegenheit für mich da, hat mich in allem unterstützt und mich immer wieder aufgemuntert.

8.5 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

8.6 Erklärungen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Interferon- α vermittelte Immuntherapie in der Friend Retrovirus Infektion“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Kathrin Gibbert befürworte.

Essen, den _____

Ulf Dittmer

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den _____

Kathrin Gibbert

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, den _____

Kathrin Gibbert